DER PERIPHERE LYMPHOZYT DES MENSCHEN

Ein Modellsystem zum Studium der kombinierten Wirkung von 8-Methoxypsoralen und langwelligem UV-Licht

Bernhard Kern

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535715_0061

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Direktor: Professor Dr. med. O. Braun-Falco

DER PERIPHERE LYMPHOZYT DES MENSCHEN - EIN MODELLSYSTEM ZUM STUDIUM DER KOMBINIERTEN WIRKUNG VON 8-METHOXYPSORALEN UND LANGWELLIGEM UV-LICHT

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bernhard Kern

aus

München

1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. O. Braun-Falco
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 29. Mai 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSÜBERSICHT

	Seite:
1. EINFÜHRUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1. Lymphozytenpräparation	9
2.2. Lymphozytentransformation	11
2.3. UVA-Bestrahlung	15
3. ERGEBNISSE	17
3.1. Abhängigkeit der Hemmung des ^{3}H-Thymidin-einbaus in die DNA PHA-stimulierter Lymphozyten von unterschiedlichen 8-MOP-Konzentrationen, die in vitro zugesetzt wurden	17
3.2. Hemmung der PHA-induzierten Transformationen von Lymphozyten, die oral verabreichtes 8-MOP in vivo aufnahmen und in vitro mit UVA bestrahlt wurden	21
3.3. Abhängigkeit der Hemmung der PHA-induzierten Lymphozytentransformation durch 8-MOP plus UVA von der Bestrahlungsdauer	23
3.4. Abhängigkeit der Hemmung der PHA-induzierten Lymphozytentransformation durch 8-MOP plus UVA vom Bestrahlungszeitpunkt	26
3.5. Kumulation des Effektes wiederholter Bestrahlungen	32
4. DISKUSSION	36
5. ZUSAMMENFASSUNG	58
6. LITERATURVERZEICHNIS	60

1. EINFÜHRUNG

Der Effekt des Zusammenwirkens einer photosensibilisierenden Substanz mit langwelligem UV-Licht wurde schon im Altertum zur Repigmentierung der Vitiligo ausgenützt (1). In Ägypten war zu diesem Zweck die orale Anwendung der getrockneten Früchte der Pflanze Ammi maius, gefolgt von einer Sonnenbestrahlung, seit alters gebräuchlich.(2). Aus diesen Früchten konnten FAHMI und ABU-SHADY (3) das Ammoidin isolieren, welches auch Xanthotoxin, Methoxsalen, 8-Methoxypsoralen oder kurz 8-MOP heißt (Abb. 1).

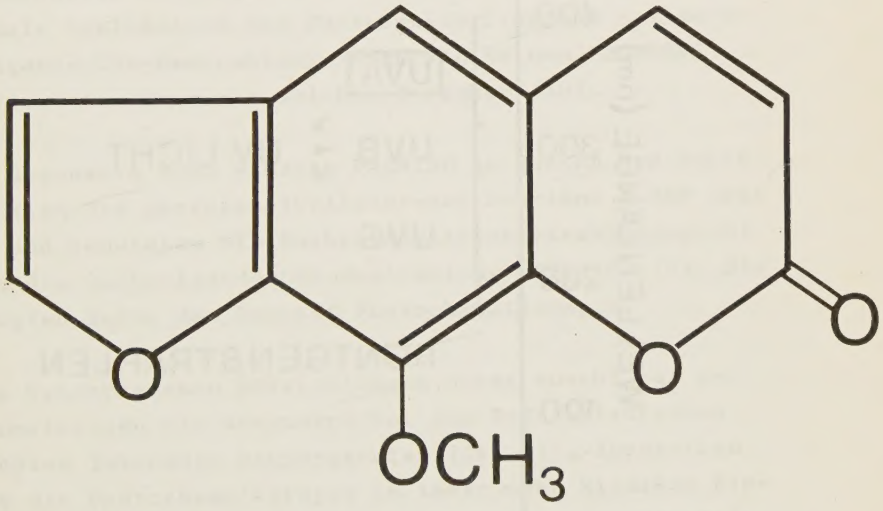

Abb. 1: Strukturformel von 8-Methoxypsoralen (8-MOP)

Diesen und andere Bestandteile von Ammi maius führte EL MOFTY dann in die moderne Therapie der Vitiligo ein.(2). FULTON (4) benutzte statt des Sonnen- oder UV-Lichtes nur das langwellige ultraviolette Licht (Blacklight, Blackbluelight oder UVA). (Abb. 2). Er stützte sich auf Ergebnisse von BUCK (5), der gezeigt hatte, daß nur langwelliges UV-Licht, besonders um 360 nm, den Photosensibilisator aktivieren kann. Eine entsprechende Leuchte war bereits von STEGMAIER angegeben worden (6).

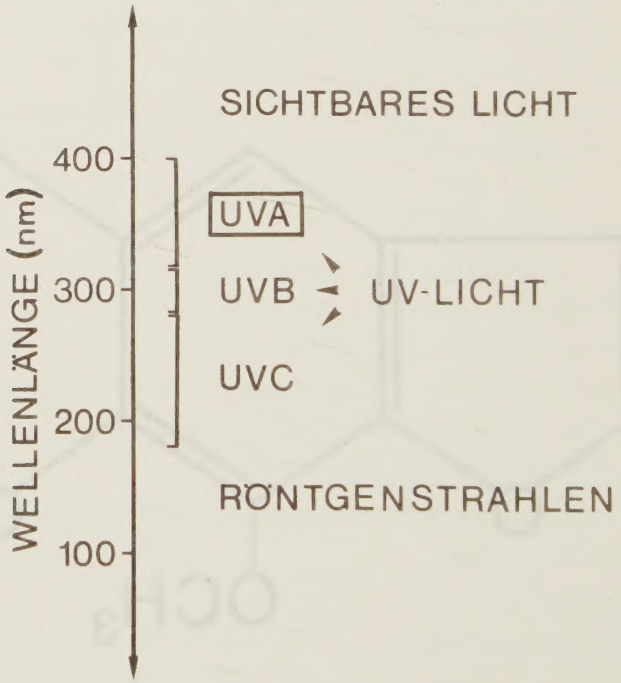

Abb. 2: Das langwellige UV-Licht (UVA) im elektromagnetischen Spektrum

In der Folgezeit wurde der Indikation Vitiligo eine ganze Anzahl weiterer Indikationen hinzugefügt. Dazu gehörten in allererster Linie Psoriasis (WEBER 7, 8; WACHTL 9, TRONNIER und SCHÜLE 10, TRONNIER und LOEHNING 11, OBERSTE-LEHN und MORTAZAWI 12 und RODERMUND und STEIN 13), dann Parapsoriasis en plaques, auch mit Übergang in das infiltrative Stadium der Mycosis fungoides (MORTAZAWI und OBERSTE-LEHN 12,14), Morbus Brocq (WEBER 8), Mycosis fungoides (TRONNIER und LOEHNING 11),Akne (TRONNIER und LOEHNING 11, MORTAZAWI und OBERSTE-LEHN 12,14, WEBER 8, WACHTL 9), Zoster (SCHÜLE 15, WEBER 8, TRONNIER und LOEHNING 11), Varicellen (SCHÜLE 15), Herpes simplex (SCHÜLE 15, WEBER 8), vulgäre Warzen (SCHÜLE 15) und das mikrobielle Ekzem (OBERSTE-LEHN und MORTAZAWI 12, WEBER 8). Diese Krankheiten behandelten die zitierten Autoren durch lokale Applikation des Photosensibilisators und nachfolgende UVA-Bestrahlung. Auch WALTER und VOORHEES berichteten über ein solches Vorgehen (16).

Im Gegensatz dazu wandten PARRISH in Boston und WOLFF in Wien die photosensibilisierende Substanz 8-MOP oral an und benutzten ein Hochintensitätsbestrahlungsgerät für die nachfolgende UVA-Bestrahlung (17, 18, 19). Sie prägten dafür den Begriff Photochemotherapie.

Die beschriebenen Entwicklungen haben sowohl bei den Dermatologen wie besonders bei den Psoriasiskranken größtes Interesse hervorgerufen (20, 21). Inzwischen hat die Photochemotherapie in immer mehr Kliniken Einzug gehalten, so daß die Zahl der Patienten, die mit ihr behandelt wird, zusammen mit der Zahl der Patien-

ten, die sich der vorher beschriebenen lokalen Variante unterziehen, sehr groß geworden ist (22, 23, 24, 25, 26).

Aber gerade angesichts dieser Tatsache, die wohl aus den großen Vorzügen und erstaunlichen Erfolgen zu erklären ist, sollte das unermüdliche Sammeln von mehr Information und Daten über die Vorgänge, die während dieser Therapie ablaufen, nicht vergessen werden. Es ist immerhin nicht möglich, den überzeugenden therapeutischen Effekt der Photochemotherapie etwa bei der Behandlung der Psoriasis auf der Basis unseres bisherigen experimentell abgesicherten Wissens in ausreichendem Maße zu erklären.

Weiterhin sollte man sich immer vor Augen halten, daß das therapeutische Prinzip der Photochemotherapie auf einer phototoxischen Wirkung beruht, deren molekularbiologische Grundlagen ebenfalls nicht vollständig bekannt sind (27).

Aus diesem unzureichenden Wissen ist leider aber auch abzuleiten, daß etwaige nachteilige Spätwirkungen besonders nach Langzeitbehandlung schlecht abgeschätzt werden können. Gerade dies wäre aber von großer Wichtigkeit.

So werden überall auf der Welt Untersuchungen angestellt mit Patienten, die unter Photochemotherapie stehen. Für die systematische experimentelle Erforschung dieser Probleme sind Versuche am Menschen je-

doch aus ethischen wie wissenschaftlichen Gründen nur begrenzt möglich. Es wurde deshalb bereits an Versuchstieren experimentiert (28), es wurden Zellkulturen von Epidermiszellen (29), Fibroblasten (30) und Tumorzellen (31) untersucht, und es wurde auch das Verhalten von Bakterien (32) und Viren (33) getestet.

In dieser Arbeit wird die phototoxische Wirkung der Photochemotherapie in Kulturen peripherer menschlicher Lymphozyten untersucht, und zwar aus folgenden Gründen:

Die peripheren Lymphozyten des Menschen können verhältnismäßig leicht gewonnen und kultiviert werden.

Proliferation, Stoffwechsel, morphologische Aspekte und funktionelle Eigenschaften dieser Zellen sind ausführlich studiert worden. Das aber ist wichtig, um über verändertes Verhalten, welches durch phototoxische Wirkungen hervorgerufen werden könnte, Aussagen machen zu können.

Weiterhin könnte der periphere Lymphozyt zu den Zellen gehören, die von der Photochemotherapie betroffen werden; denn bei der oralen Anwendung von Psoralen sind phototoxische Reaktionen nicht auf die Epidermis beschränkt. Das langwellige UV-Licht penetriert in die Dermis (34, 35, 36), und es besteht bei der systemischen Photochemotherapie ein ansteigender Gradient der Psoralenkonzentration von den Epidermiszellen bis zu den oberflächlichen dermalen Blutgefäßen.

Möglicherweise ist der therapeutische Effekt der Photochemotherapie bei den verschiedenen oben genannten Hautkrankheiten wenigstens zum Teil auch auf eine Beeinflussung dermaler entzündlicher Infiltrate zurückzuführen. Dafür könnte sprechen, daß Lymphozyteninfiltrate in der Haut von Patienten mit Mycosis fungoides erfolgreich durch die Photochemotherapie behandelt worden sind (24, 37, 38).

Als Funktionstest wurde in dieser Arbeit der Lymphozytentransformationstest angewandt (39). Er versprach interessante Ergebnisse zu liefern, da man mit ihm die DNA-Synthese in phytohaemagglutinin-stimulierten Lymphozyten mißt. Die DNA-Synthese kann aber durch Psoralen plus UVA gehemmt werden. Dies ist an Epidermiszellen und Fibroblasten bereits gezeigt worden (29, 30, 40).

Bei allen Versuchen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, erfolgte die UVA-Bestrahlung in vitro. Das 8-MOP hingegen wurde nur bei einem Teil der Versuche in vitro zugesetzt (27), beim anderen Teil wurde es von den Versuchspersonen oral eingenommen und in vivo von den Lymphozyten eingebaut (41).

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Tabellen 1 und 2 geben einen Überblick über die wesentlichen Punkte im Ablauf der Versuche

Tab. 1: In-vitro-Versuche

Blutabnahme:
20 ml Venenblut in mit Heparin versetzter Spritze

↓

Lymphozytenpräparation:
Zentrifugieren in Ficoll-Isopaque-Lösung,
Abheben des Lymphozytenrings und Waschen in Kulturmedium

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Beschicken der Mikrotiterplatte:

Kontroll-gruppe 1	Kontroll-gruppe 2	Kontroll-gruppe 3	Versuchs-gruppe	Nullwert-gruppe
AB-Serum	AB-Serum	AB-Serum	AB-Serum	AB-Serum
Lympho-zytensusp.	Lympho-zytensusp.	Lympho-zytensusp.	Lympho-zytensusp.	Lympho-zytensusp.
		8-MOP-Verd.	8-MOP-Verd.	8-MOP-Verd. (zum Teil
	UVA-Be-strahlung		UVA-Be-strahlung	
Kultur-medium	Kultur-medium	Kultur-medium	Kultur-medium	Kultur-medium
PHA	PHA	PHA	PHA	

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Inkubation der Mikrotiterplatte bei 37°C für 72 Stunden

↓

Zugabe von ^{3}H-Thymidin

↓

Weitere Inkubation bei 37°C für 14 Stunden

↓

Ernten der Zellkulturen

↓

Messen des Einbaus von ^{3}H-Thymidin in die DNA der Lymphoblasten

Tab. 2: Kombinierte in-vivo-in-vitro-Versuche

Blutabnahme:

10 ml Venenblut in mit Heparin versetzter Spritze, einige ml in heparinfreier Spritze; vor oraler Applikation von 8-MOP

10 ml Venenblut in mit Heparin versetzter Spritze, einige ml in heparinfreier Spritze; 2 Stunden nach oraler Applikation von 8-MOP

Lymphozytenpräparation:

Zentrifugieren in Ficoll-Isopaque-Lösung,
Abheben des Lymphozytenrings und Waschen in Kulturmedium

Beschicken der Mikrotiterplatte:

Kontroll-gruppe 1	Kontroll-gruppe 2	Nullwert-gruppe	Kontroll-gruppe 3	Versuchs-gruppe	Nullwert-gruppe
Eigen-serum	Eigen-serum	Eigen-serum	Eigen-serum	Eigen-serum	Eigen-serum
Lympho-zytensusp.	Lympho-zytensusp.	Lympho-zytensusp.	Lympho-zytensusp.	Lympho-zytensusp.	Lympho-zytensusp.
	UVA-Be-strahlung			UVA-Be-strahlung	
Kultur-medium	Kultur-medium	Kultur-medium	Kultur-medium	Kultur-medium	Kultur-medium
PHA	PHA		PHA	PHA	

Inkubation der Mikrotiterplatte bei 37°C für 72 Stunden

Zugabe von ^{3}H-Thymidin

Weitere Inkubation bei 37°C für 14 Stunden

Ernten der Zellkulturen

Messen des Einbaus von ^{3}H-Thymidin in die DNA der Lymphoblasten

2.1. Lymphozytenpräparation

Für alle in-vitro-Versuche wurde Blut von gesundem Laborpersonal oder von Ambulanzpatienten mit leichten Hautkrankheiten verwendet. Für die kombinierten in-vivo-in-vitro-Versuche stellten sich gesunde Mitarbeiter der Klinik und andere freiwillige Spender zur Verfügung. Die Probanden wurden nicht nach Alter oder Geschlecht getrennt berücksichtigt.

20 ml Venenblut wurden jedem Spender für die in-vitro-Versuche entnommen. Dabei kamen großkalibrige Kanülen zur Verwendung und Einmalspritzen aus Plastik, die vorher mit jeweils 0,2 ml Phenol-freiem Heparin (5000 IU/ml) beschickt worden waren.

Für die kombinierten in-vivo-in-vitro-Versuche wurden in gleicher Weise 10 ml Venenblut entnommen, zusätzlich jedoch noch einige ml in Heparin-freie Spritzen gezogen und in sterile Plastikreagenzröhrchen verbracht, um daraus Eigenserum zu gewinnen.

An diese Blutabnahme schloß sich bei den kombinierten Versuchen die orale Einnahme von 8-MOP in Form von Psorasynt-Tabletten 8-MOP/10 mg an (Hermal-Chemie Kurt Herrmann, Reinbek b. Hamburg). Die Dosierung richtete sich nach dem von PARRISH e.a. (17) für die Psoriasistherapie angegebenen Dosiervorschlag, der auch in unserer Klinik die Dosierungsgrundlage darstellt (26).

Zwei Stunden nach der Einnahme, während derer sich der Proband, wie den ganzen Tag über, nicht dem Sonnenlicht aussetzen sollte, erfolgte eine zweite Blutabnahme analog der ersten.

Zur Lymphozytenpräparation wurde das heparinisierte Blut in sterilen 50 ml-Zentrifugenröhrchen einem gleichen Volumen Ficoll-Isopaque Lösung (spez.Gew.: 1,077) langsam und vorsichtig überschichtet und bei 700 g 18 - 20 min. zentrifugiert. Diese wie auch alle anderen Zentrifugierungen von Röhrchen fanden in einer Zentrifuge vom Typ Minifuge (Heraeus Christ GmbH, Osterode) statt.

Die flottierende Zellschicht wurde mit einer sterilen Einmal-Pasteur-Pipette abgenommen und in sterile Plastikreagenzröhrchen übertragen. Nach Auffüllen mit Kulturmedium auf etwa 10 ml wurde ca. 15 min. bei etwa 160 g zentrifugiert. Das Kulturmedium enthielt 10 ml Medium 199 (10 x konz.) (Gibco Bio-Cult, Glasgow, Schottland), 2,5 ml Hepes Puffer (1 M), 1,2 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml), 3 ml Natriumbicarbonat (7,5 % Lösung), Aqua pro injectione ad 100 ml. Der Überstand an Kulturmedium wurde verworfen, der Bodensatz aufgeschüttelt und wieder mit Kulturmedium versetzt, worauf eine zweite, manchmal auch dritte Zentrifugation folgte. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Bodensatz in etwa so viel Kulturmedium resuspendiert, daß die entstandene Zellkonzentration um 5 Mill./ml betrug.

Bei den kombinierten in-vivo-in-vitro-Versuchen folgte hierauf die exakte Einstellung auf diesen Wert. Zu diesem Zweck wurde wie bei der Zählung von Leukozyten in der klinischen Routine verfahren. D.h. es wurde eine Leukozytenpipette bis zum Skalenwert 1 mit der Lymphozytensuspension gefüllt und dann 3%-Essigsäure bis zum Skalenwert 11 nachgezogen. Nach 5-minütigem Schütteln wurde eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und in allen vier Großquadraten die Lymphozytenzahl bestimmt. Aus diesem Wert wurde dann berechnet, wieviel Kulturmedium zur Lymphozytensuspension noch hinzugefügt werden mußte, um die endgültige Konzentration von 5 Mill./ml zu erhalten.

2.2. Lymphozytentransformation

20 µl der erhaltenen Lymphozytensuspension, also etwa $1,0 \times 10^5$ Zellen, und 20 µl steriles AB Serum wurden pro Loch auf sterile Flachboden-Mikrotiterplatten (System Cooke, Greiner, Nürtingen) übertragen. Dabei fanden Einmal-Tuberculin-Spritzen (Becton, Dickinson and Co. Ltd. Dunlaoghaire, Co. Dublin, Irland) und ein modifiziertes Dosiergerät (Hamilton Co. Reno, Nevada, USA) Verwendung.

Bei den in-vitro-Versuchen kamen noch jeweils 20 µl der entsprechenden 8-MOP-Verdünnung pro Loch dazu. Die Verdünnungen wurden folgendermaßen hergestellt:

8-MOP (Mol.-Gew.: 216,18) wurde Oxsoralen^{R} Kapseln (Paul B. Elder Co., Bryan, Ohio, USA) entnommen. Durch eine Verdünnungsreihe mit Kulturmedium kamen die verschiedenen Konzentrationen zustande. Das 8-MOP löste sich jedoch nur in niedrigen Konzentrationen. So ergab sich mit zunehmender Konzentration eine 8-MOP-Suspension. Dennoch wurde kein Alkohol zur Erhöhung der Löslichkeit verwendet, da dieses Vorgehen die Lymphozytentransformation unter Umständen hätte beeinflussen können.

Bei den kombinierten in-vivo-in-vitro-Versuchen wurde statt AB-Serum Eigenserum verwendet. Dazu wurde das zusätzlich abgenommene nicht heparinisierte Blut nach einiger Zeit ruhigen Stehens 10 min. bei 800 g zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde dann entsprechend dem AB-Serum auf die Platten verteilt, wobei Serum und Lymphozytensuspension von derselben Blutabnahme stammten.

Alle Vorgänge zur Beschickung der Mikrotiterplatten fanden in einem Laminar Flow Gerät statt (Ceag Schirp Reinraumtechnik, Bork/Westfalen).

Zur UVA-Bestrahlung (siehe eigenes Kapitel) wurden die Mikrotiterplatten, um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu vermeiden, mit einer selbstklebenden durchsichtigen Plastikfolie bedeckt.

Nach der Bestrahlung, bei den Versuchen, die der Abbildung 14 zugrunde liegen, bereits davor, wurden je 200 µl PHA enthaltendes Kulturmedium in jedes Loch

verbracht. Dabei wurden 10-ml-Einmalspritzen (Becton, Dickinson and Co. Ltd. Dunloaghaire, Co. Dublin, Irland) und ein modifiziertes Dosiergerät (Hamilton Co. Reno, Nevada, USA) benutzt. Ausgenommen waren die Löcher, in denen die Zellen als Kontrollen nicht stimuliert werden sollten; sie erhielten das Kulturmedium ohne PHA-Zusatz. Sonst betrug die PHA-Konzentration etwa 0,4 ml Phytohaemagglutinin HA 15, Lot K 9895 (Wellcome Research Laboratories, Beckenham, England) pro 100 ml Kulturmedium.

Alle Kulturen wurden 3 Tage bei 37°C inkubiert (Inkubator Heraeus Christ GmbH, Osterode), bevor sie mit ^{3}H-markiertem Thymidin (TRA 120, The Radiochemical Centre, Amersham, England), spez. Aktivität 5 Ci/mmol, versetzt wurden (1 µCi/Kultur). Dabei fanden wieder die bereits oben erwähnten Einmal-Tuberculin-Spritzen und das Dosiergerät Verwendung. Danach wurden die Kulturen nochmals für etwa 14 Stunden inkubiert, worauf sie für 10 min. bei 1800 U/min. zentrifugiert wurden (Labofuge II, Heraeus Christ GmbH, Osterode). Das überstehende Kulturmedium wurde durch Umdrehen und Aufstoßen der Platten auf einer saugkräftigen Filterpapierschicht entfernt. Nun konnte der Arbeitsgang durch Einfrieren der Platten bei -23°C unterbrochen werden oder aber es folgte gleich der abschließende Versuchsteil.

Hierfür wurden die Mikrotiterplatten mit je 200 µl Trypsinlösung pro Loch beschickt. Wieder fanden die 10 ml-Einmalspritzen und das Dosiergerät Verwendung. Die Lösung bestand aus 250 mg Trypsin (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) pro 100 ml physiol.Kochsalzlösung.

Nach 10-minütigem Schütteln der Platten (AM 69 Microshaker, Cooke Microtitersystem) wurden sie in ein halbautomatisches Probenerntegerät (Hiller Co., Scientific Equipment, Madison, Wisconsin, USA) (Abb. 3) verbracht, wo die Kulturen auf Glasfiberfilterstreifen (Whatman, CMS, Größe 1,3 x 19,5 cm) übertragen wurden.

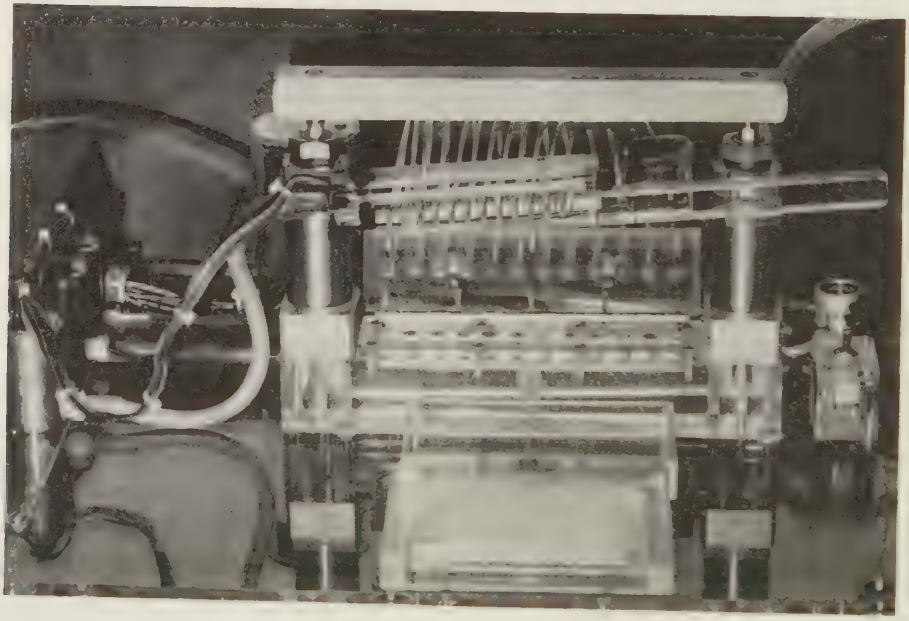

Abb. 3: Halbautomatisches Probenerntegerät (Hiller Co., Scientific Equipment, Madison, Wisconsin, USA)

Nachdem die Streifen getrocknet waren, wurden sie so zerschnitten, daß auf jedem Abschnitt die einem Loch auf der Mikrotiterplatte entsprechende Kultur zu finden war.

Diese Abschnitte kamen dann in Scintillationszählröhrchen und wurden mit jeweils etwa 5 ml Scintillationsflüssigkeit bedeckt. Hierauf wurde für je 1 min. im Scintillationszähler gezählt (Packard Model 3380).

Bei allen Versuchen wurden jeweils mindestens Fünffachbestimmungen durchgeführt.

2.3. UVA-Bestrahlung

Die Zellen wurden in derselben UVA-Bestrahlungseinheit bestrahlt, die zur Zeit in unserer Klinik zur Bestrahlung von Patienten benützt wird (UVA-Liegebox, Typ S IV, ausgerüstet mit 70 Sylvania GTE Fluoreszenzlampen, Hersteller: Seliger GmbH, Wien, Österreich) (Abb. 4).

Die jeweils nicht bestrahlte Zellgruppe befand sich immer mit auf derselben Mikrotiterplatte, wurde aber mit festem, lichtundurchlässigem Papier abgedeckt und so vor der Bestrahlung geschützt. Der UVA-Output war 4,5 mWatt/cm^2 (Ultraviolet meter, Blak-Ray, Model J-221, Ultraviolet Products Inc., San Gabriel, Calif., USA).

Abb. 4: UVA-Liegebox, Typ S IV, ausgerüstet mit 70 Sylvania GTE Fluoreszenzlampen, Hersteller: Seliger GmbH, Wien, Österreich

Alle Versuche wurden unter Vermeidung von direkter Sonnenlichteinwirkung durchgeführt, da das Sonnenlicht einen hohen Anteil intensiver UVA-Strahlung besitzt.

3. ERGEBNISSE

Hemmung der Phytohaemagglutinin-induzierten Lymphozytentransformation durch 8-Methoxypsoralen plus UVA-Bestrahlung

3.1. Abhängigkeit der Hemmung von unterschiedlichen 8-MOP-Konzentrationen, die in vitro zugesetzt wurden

Die PHA-induzierte Lymphozytentransformation kann durch 8-MOP in Verbindung mit UVA-Bestrahlung gehemmt werden. Eine 30-minütige Bestrahlung alleine hat diesen Effekt nicht. 8-MOP ohne UVA-Bestrahlung hemmt den ^{3}H-Thymidin-Einbau nur, wenn die Konzentrationen von 8-MOP 5000 mal höher sind als die, welche zusammen mit UVA in der Lage sind, eine Hemmung hervorzurufen (Abb. 5).

Diese Befunde sprechen für eine echte Photoaktivierung, da die Wärmeenergie, die durch die Inkubation bei 37°C, also etwa Körpertemperatur, zugeführt wird, offensichtlich keine 8-MOP-DNA-Addukte hervorruft, welche die DNA-Replikation in den Lymphozyten signifikant hemmen könnten.

In Abbildung 5 sind die Ergebnisse der in-vitro-Versuche mit den Lymphozytenkulturen von 8 Spendern zusammengefaßt. Es wurden jeweils Fünffachbestimmungen durchgeführt.

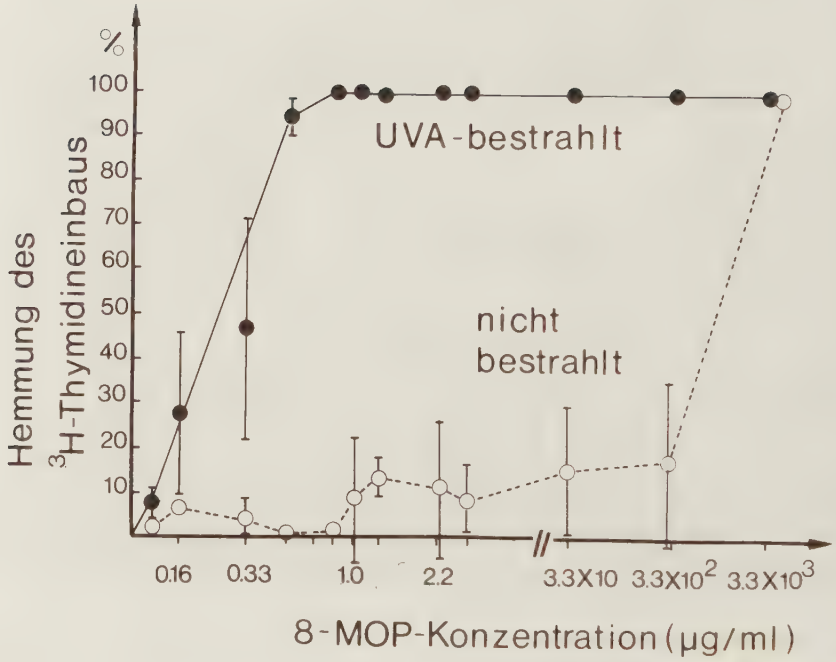

Abb. 5: Hemmung des ^{3}H-Thymidineinbaus in die DNA PHA-stimulierter Lymphozyten in Gegenwart verschiedener 8-MOP-Konzentrationen, die in vitro zugesetzt wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen von 8 Spendern. Die UVA-Bestrahlung (30 min.) wurde vor der PHA-Zugabe durchgeführt

Die eingebaute Radioaktivität bei den Lymphozytenkulturen, die nicht mit 8-MOP versetzt wurden, war in etwa die gleiche, ob die Kulturen bestrahlt wurden oder nicht. So wurden aus den Werten dieser Kulturen die Mittelwerte berechnet und davon die jeweiligen O-Werte, d.h. die Einbauraten der nicht stimulierten Zellen, die immer mit auf der gleichen Mikrotiterplatte waren, abgezogen. Diese O-Werte-Subtraktion wurde automatisch bei allen Werten in allen Versuchen vorgenommen. Die so erhaltenen Werte stellten dann den jeweiligen Referenzwert (= 0 % Hemmung) dar.

Die Mittelwerte der Fünffachbestimmungen von den Kulturen, die 8-MOP erhielten, wurden prozentual zum jeweiligen Referenzwert ausgedrückt. Die Striche geben die Standardabweichung der Ergebnisse der verschiedenen Spender an.

Es ergab sich im Bereich 0,1 - 1,0 µg/ml 8-MOP-Konzentration bei 30-minütiger UVA-Bestrahlung ein starker Anstieg der Einbauhemmung, der ohne Bestrahlung erst bei sehr viel höheren 8-MOP-Konzentrationen zu verzeichnen war.

Abbildung 6 zeigt die 8-MOP-Dosis-Abhängigkeit der DNA-Synthese-Hemmung in der Lymphozytenpopulation eines Spenders in einem in-vitro-Versuch. Die prozentuale Hemmung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus wurde wie für Abbildung 5 berechnet. Die Striche geben hier die Standardabweichung der jeweiligen Fünffachbestimmung an.

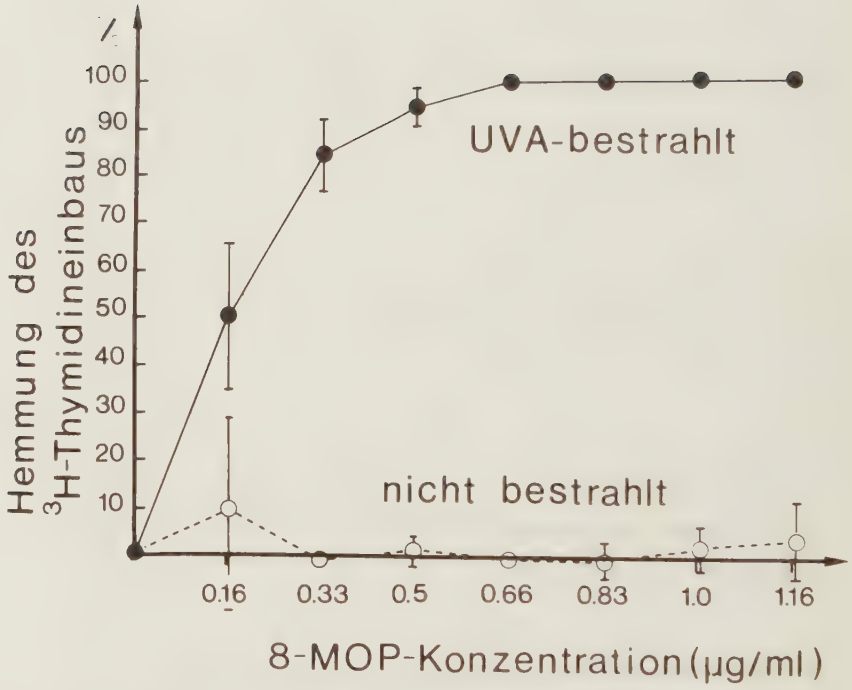

Abb. 6: Hemmung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus in die DNA PHA-stimulierter Lymphozyten in Gegenwart verschiedener 8-MOP-Konzentrationen, die in vitro zugesetzt wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 5 Parallelbestimmungen bei einem Spender

3.2. Hemmung der PHA-induzierten Transformation von Lymphozyten, die oral verabreichtes 8-MOP in vivo aufnahmen und in vitro mit UVA bestrahlt wurden

In den peripheren Lymphozyten des Menschen können nach oraler Aufnahme von 8-MOP in therapeutischen Dosen solche Konzentrationen erreicht werden, daß bei nachfolgender UVA-Bestrahlung in vitro die PHA-induzierte Transformation dieser Lymphozyten signifikant gehemmt wird (41).

Diese Tatsache zeigt die Abbildung 7. Hier sind die Ergebnisse von 10 Spendern zusammengefaßt. Als Referenzwert für die prozentuale Auftragung der ^{3}H-Thymidin-Einbauhemmung wurde der Mittelwert der jeweiligen nicht bestrahlten Lymphozytengruppe genommen. Von jedem Probanden wurden so zwei Werte erhalten, der eine von den Lymphozyten, die aus dem Blut stammten, welches vor der 8-MOP-Einnahme entnommen wurde, der andere von den nach der Einnahme gewonnenen. Die Striche zeigen die Standardabweichung der jeweiligen Mehrfachbestimmungen (mindestens Fünffachbestimmungen) bei den verschiedenen Probanden an.

Trotz der individuellen Schwankungen bei der Reaktion auf UVA sowohl vor, als auch nach 8-MOP-Einnahme, ist der deutliche Unterschied in der DNA-Synthesehemmung zu erkennen.

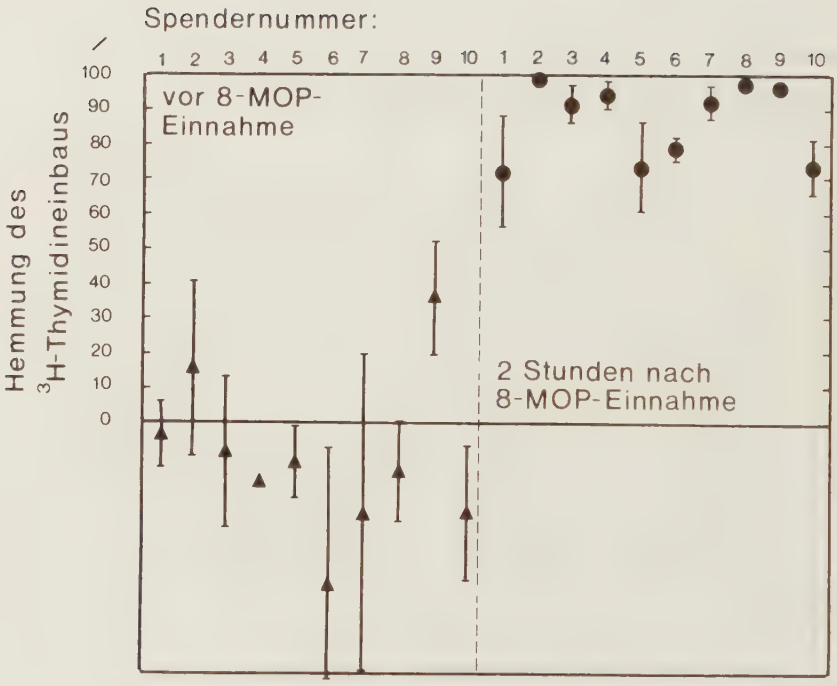

Abb. 7: Hemmung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus in die DNA PHA-stimulierter Lymphozyten von 10 Spendern vor und 2 Stunden nach oraler Einnahme von 8-MOP. UVA-Bestrahlungszeit: 30 min.

3.3. Abhängigkeit der Hemmung der PHA-induzierten Lymphozytentransformation durch 8-MOP plus UVA von der Bestrahlungsdauer

3.3.1. In-vitro-Experiment für zwei verschiedene 8-MOP-Konzentrationen

Aus der Abbildung 8 läßt sich anhand eines repräsentativen in-vitro-Experiments mit Lymphozyten eines Spenders für zwei verschiedene 8-MOP-Konzentrationen die Abhängigkeit der DNA-Synthesehemmung von der Dauer der UVA-Bestrahlung ablesen. Wie zu erwarten, bewirkt eine längere Bestrahlungszeit auch eine vermehrte DNA-Synthesehemmung in den Lymphozyten.

Die Striche geben wieder die Standardabweichung der jeweiligen Fünffachbestimmung an. Als Referenzwert wurde der Mittelwert der nicht bestrahlten Lymphozytengruppe genommen.

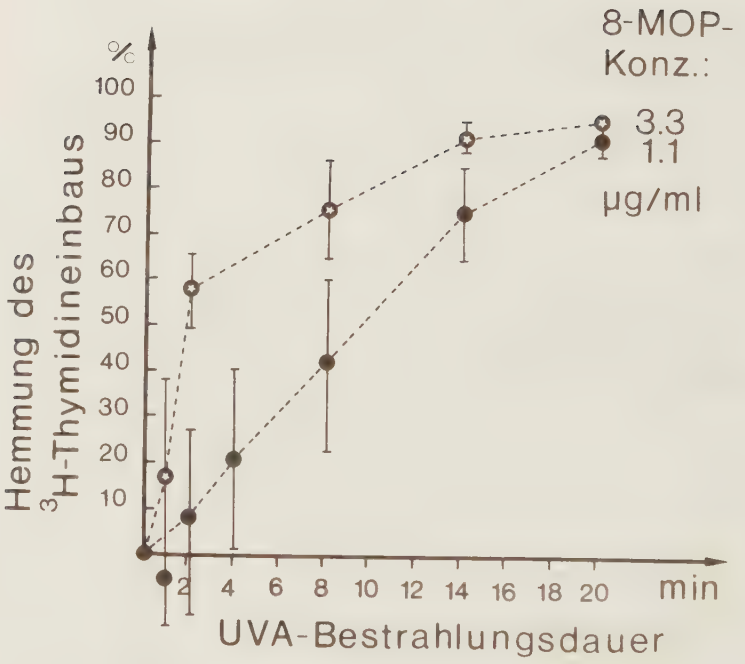

Abb. 8: Einfluß der UVA-Bestrahlungsdauer und der 8-MOP-Konzentration im Kulturmedium auf den ^{3}H-Thymidin-Einbau in die DNA PHA-stimulierter Lymphozyten. Die 8-MOP-Verdünnungen wurden in vitro zugesetzt

3.3.2. Kombiniertes in-vitro-in-vivo-Experiment

Abbildung 9 repräsentiert den kombinierten in-vivo-in-vitro-Versuch, der analog dem der Abbildung 8 die Abhängigkeit der DNA-Synthesehemmung von der UVA-Bestrahlungsdauer untersuchten sollte. Der Referenzwert für die prozentuale Auftragung ist wieder der Mittelwert aus der nicht bestrahlten Lymphozytengruppe. Die Standardabweichungen der jeweiligen Fünffachbestimmungen sind durch die Striche angezeigt.

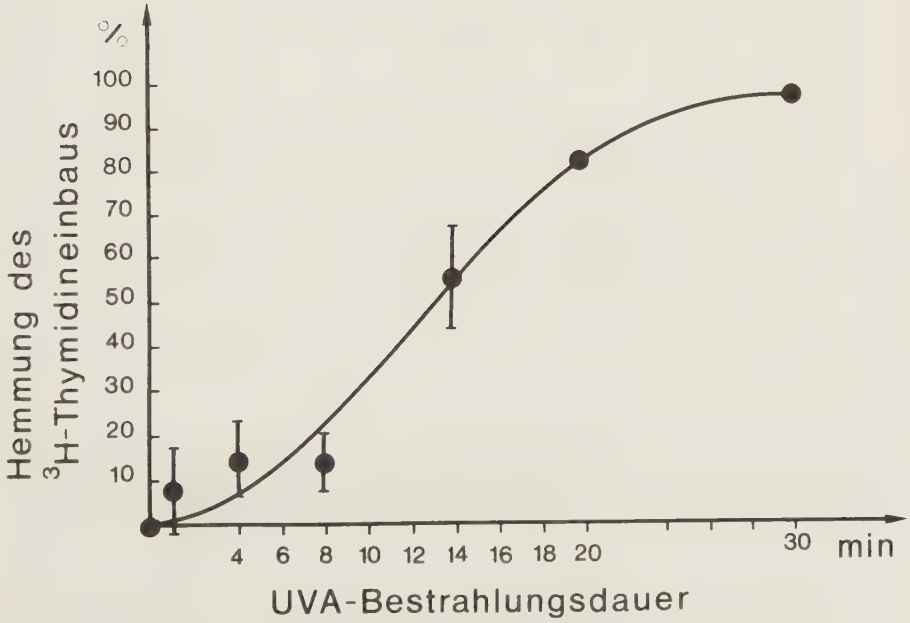

Abb. 9: UVA-dosisabhängige Hemmung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus in die DNA PHA-stimulierter Lymphozyten eines Spenders nach oraler Einnahme von 8-MOP. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 5 Parallelbestimmungen

Die Kurve zeigt, daß sich auch das in vivo in die Lymphozyten gelangte 8-MOP umso stärker in der DNA-Synthesehemmung auswirkt, je länger die UVA-Exposition gedauert hat.

Vergleicht man Abbildung 8 und 9, so kann man annehmen, daß die aktuelle 8-MOP-Konzentration im Serum während der therapeutischen Anwendung etwas niedriger liegt als die 8-MOP-Konzentration von 1,1 µg/ml Kulturmedium in vitro. Denn für eine gleiche ^{3}H-Thymidin-Einbauhemmung ist eine längere UVA-Bestrahlungsdauer bei den Lymphozyten notwendig, die das 8-MOP in vivo eingebaut haben, als bei denen, die in vitro mit 8-MOP in der Konzentration von 1,1 µg 8-MOP/ml Kulturmedium behandelt wurden.

3.4. Abhängigkeit der Hemmung der PHA-induzierten Lymphozytentransformation durch 8-MOP plus UVA vom Bestrahlungszeitpunkt - Unterschiedliche Wirksamkeit der UVA-Bestrahlung während verschiedener Zellzyklusphasen

3.4.1. In-vitro-Experimente

Nach der Abhängigkeit der DNA-Synthesehemmung von der Dauer der UVA-Bestrahlung schien die Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung besonders interessant zu sein.

Um diese herauszufinden, wurde zunächst wie immer bei den in-vitro-Versuchen vorgegangen. Bevor jedoch in

jedes Loch der Mikrotiterplatte 200 µl PHA-enthaltendes Kulturmedium verbracht wurden, wurden zunächst nur fünf Löcher 30 min. mit UVA bestrahlt. Jeweils die nächsten fünf Löcher folgten im Abstand von etwa 12 Stunden. Die letzten wurden kurz vor der ^{3}H-Thymidinzugabe bestrahlt (Abb. 10).

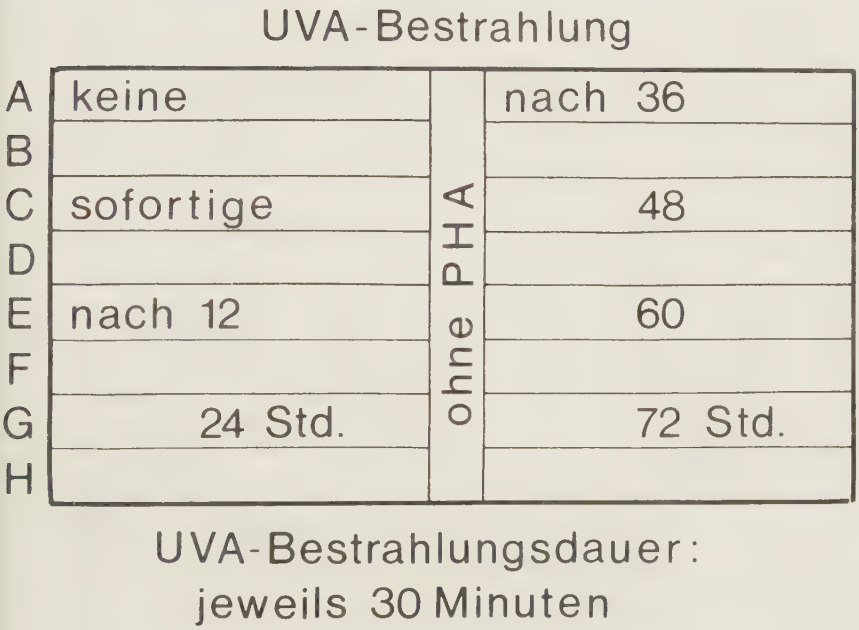

Abb. 10: UVA-Bestrahlungsschema der Lymphozyten auf einer Mikrotiterplatte bei den Experimenten zur Ermittlung der Abhängigkeit der DNA-Synthesehemmung vom Bestrahlungszeitpunkt

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse aus den Versuchen mit den Lymphozyten von vier Spendern aufgetragen. Der Referenzwert wurde wie für Abbildung 6 berechnet. Die Striche stehen für die Standardabweichung der Ergebnisse der vier verschiedenen Spender.

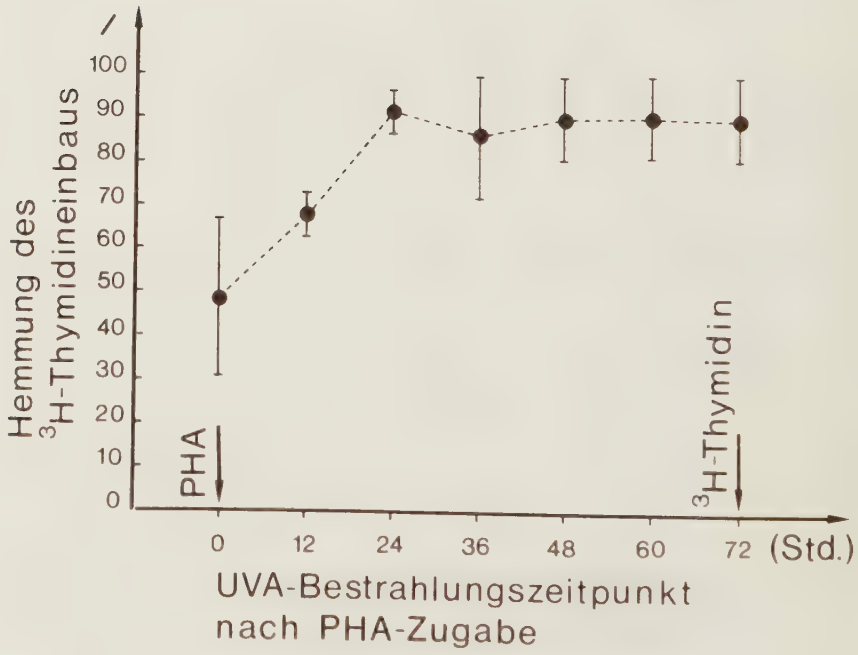

Abb. 11: Auswirkung einer zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHA-Zugabe verabreichten UVA-Bestrahlung (30 min.) auf Lymphozyten, die in vitro mit 8-MOP behandelt wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Lymphozytenpräparationen von 4 Spendern

Aus der erhaltenen Kurve läßt sich deutlich eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen, die 8-MOP in vitro eingebaut hatten, gegenüber der zu verschiedenen Zeitpunkten verabreichten UVA-Bestrahlung ablesen.

Nachdem die Zellen, in erster Linie T-Lymphozyten, durch PHA zu einer weitgehend synchronen Proliferation angeregt wurden (42) und damit zum großen Teil gemeinsam die gleichen Zellzyklusphasen durchlaufen, ist es nur verständlich, daß sowohl Phasen mit stärkerer, wie solche mit schwächerer Empfindlichkeit in Abbildung 11 zu erkennen sind.

Im Diskussionskapitel wird noch genauer auf diese Befunde eingegangen.

3.4.2. Kombinierte in-vitro-in-vivo-Experimente

Entsprechend der Abbildung 11 wurde die Abhängigkeit der ^{3}H-Thymidin-Einbauhemmungen vom UVA-Bestrahlungszeitpunkt nun auch in kombinierten in-vivo-in-vitro-Versuchen untersucht. Zu diesem Zweck wurde wie bei den Versuchen zur Abbildung 11 vorgegangen, nur daß das 8-MOP nicht in vitro zugesetzt wurde, sondern in vivo in die Lymphozyten kam, und daß bei zwei Probanden jeweils eine Bestrahlungszeit von 10 Minuten gewählt wurde, bei einem Probanden eine solche von 30 Minuten.

Die Ergebnisse der drei Versuche sind für jeden Probanden getrennt in Abbildung 12 aufgetragen. Die Striche geben die Standardabweichungen aus den Fünffachbestimmungen an. Als Referenzwert dient jeweils wieder der Mittelwert der nicht bestrahlten Lymphozytengruppe.

Stellt man individuelle Empfindlichkeitsunterschiede in Rechnung, so läßt sich doch allen Kurven eine deutliche Zweigipfeligkeit zusprechen, die bei den in-vitro-Versuchen nicht so deutlich vorhanden war.

Möglicherweise wurde hier nicht im optimalen Dosisbereich gearbeitet. Es werden ja bei diesen Versuchen schnell sehr hohe Hemmungswerte erreicht; dies könnte für das Fehlen einer deutlicheren Zweigipfeligkeit im Kurvenverhalten der Abbildung 11 verantwortlich sein.

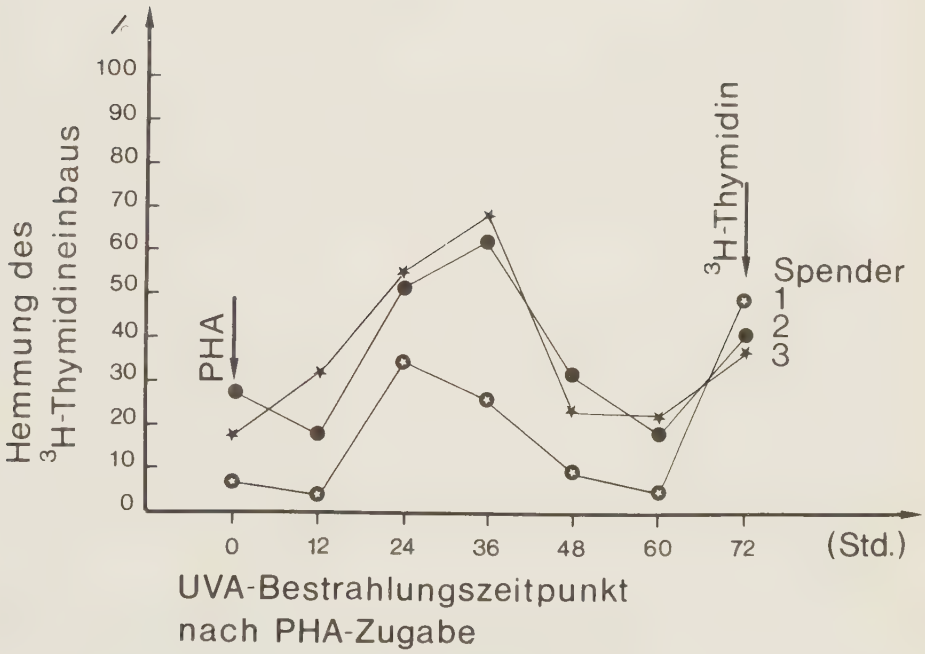

Abb. 12: Unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber einer UVA-Bestrahlung zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHA-Zugabe bei den Lymphozyten von 3 Spendern, die 8-MOP oral eingenommen hatten. Die Lymphozyten von Spender 1 und 2 wurden jeweils 10 min., die Lymphozyten von Spender 3 jeweils 30 min. bestrahlt

3.5. Kumulation des Effektes wiederholter UVA-Bestrahlungen

Als letzte Fragestellung war noch das Problem der Kumulation zu untersuchen. Wie verhalten sich die Einbauhemmungen, wenn zwar nur ganz kurze Zeit, dafür aber wiederholt im Abstand von jeweils etwa 12 Stunden das UVA-Licht einwirkt?

Dazu wurde auf der einen Hälfte der Mikrotiterplatte analog dem Versuch der Abbildung 8 vorgegangen. Allerdings wurde nur die höhere 8-MOP-Konzentration in vitro zugesetzt, das PHA-enthaltende Medium war jedoch schon bei der Bestrahlung auf der Mikrotiterplatte. Dies war auch auf der anderen Plattenhälfte so, die Bestrahlung erfolgte dort aber nur zwei Minuten lang.

Nach 12 Stunden Inkubation wurden auf dieser Plattenseite die Lymphozyten wieder für zwei Minuten bestrahlt, ausgenommen der nicht bestrahlten Gruppe und einer Gruppe, die nur die ersten zwei Minuten bestrahlt wurde. In dieser Weise wurde weiter verfahren, bis die absoluten Bestrahlungsdosen auf beiden Plattenhälften die gleichen waren, nur daß sie auf der einen Seite sofort hintereinander und auf der anderen fraktioniert verabreicht wurden (Abb. 13).

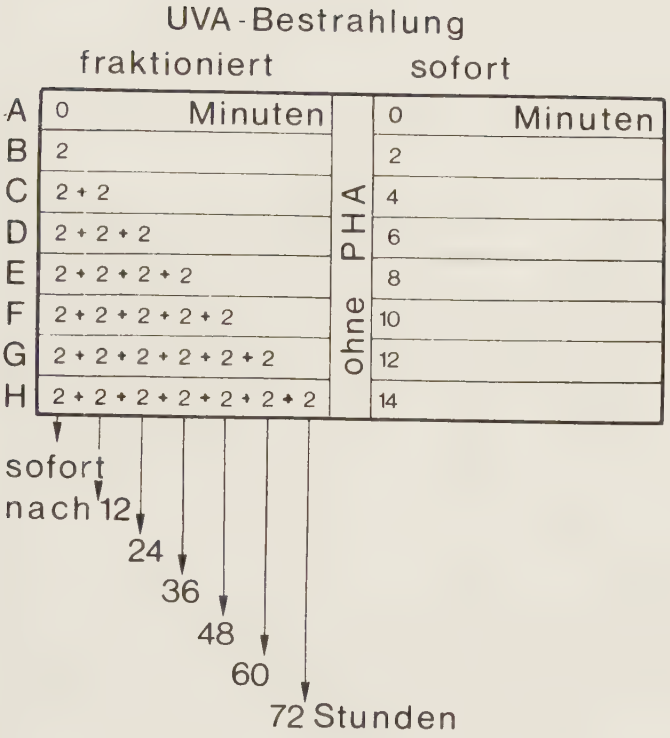

Abb. 13: UVA-Bestrahlungsschema der Lymphozyten auf einer Mikrotiterplatte bei den Experimenten zur Ermittlung des kumulativen Effektes wiederholter UVA-Bestrahlungen

In Abbildung 14 ist das Ergebnis dieses Experiments bei drei verschiedenen Spendern festgehalten. Als Referenzwert dient wieder der Mittelwert der nicht bestrahlten Lymphozytengruppe. Die Striche sind Ausdruck der Standardabweichung der drei Spender.

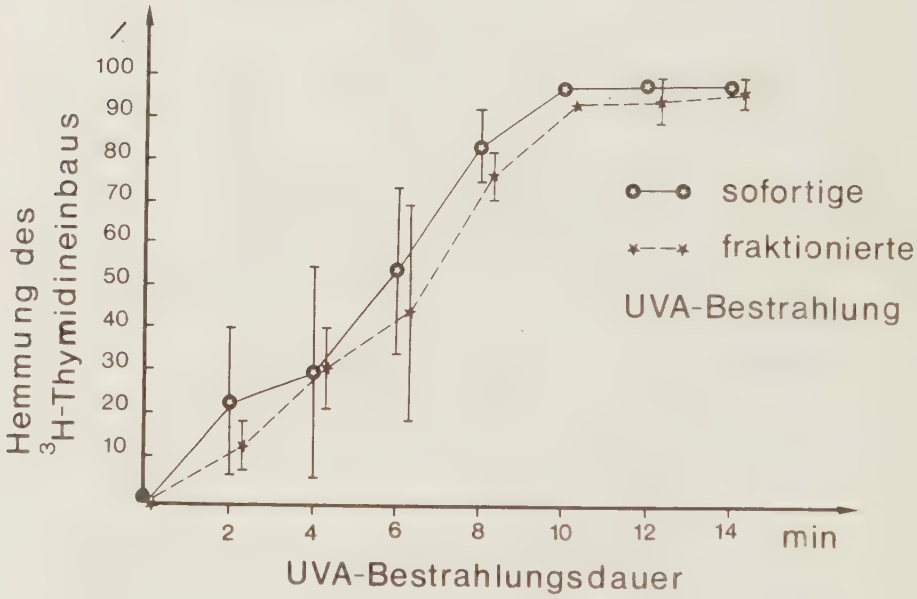

Abb. 14: Vergleich der Auswirkungen sofort und fraktioniert verabreichter Einzeldosen von UVA auf den ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA PHA-stimulierter Lymphozyten, die in vitro mit 8-MOP behandelt wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Lymphozytenpräparationen von 3 Spendern

Nachdem die beiden Kurven für die sofortige und die fraktionierte Bestrahlung nicht wesentlich voneinander abweichen, kann man in der Tat von einer Kumulation des Effektes wiederholter UVA-Bestrahlungen sprechen.
Diese Tatsache ist im Hinblick darauf von Bedeutung, daß die Patienten, die sich einer Photochemotherapie unterziehen, auch wiederholt mit UVA bestrahlt werden.

Obwohl diese Befunde an Lymphozyten erhoben wurden, die in vitro mit 8-MOP behandelt wurden, kann doch auf Grund der anderen Versuchsergebnisse kein wesentlicher Unterschied bei solchen Lymphozyten erwartet werden, die 8-MOP in vivo eingebaut haben.

4. DISKUSSION

Die Studien über den Wirkungsmechanismus von Psoralen plus UVA-Bestrahlung haben schon früh eine Interaktion von Psoralenmolekülen mit dem DNA-Molekül ergeben (43). Es stellte sich heraus, daß sich die Psoralenmoleküle an die Pyrimidinbasen der DNA binden, wobei C_4-Cycloadditionsprodukte entstehen (44).

An der Thyminbase wird dabei die 5,6-Doppelbindung angegriffen und die Psoralenmoleküle reagieren mit ihrer 4',5'- oder 3,4-Doppelbindung. So entstehen monofunktionale Photoaddukte. Es ist aber auch möglich, daß die beiden Doppelbindungen gleichzeitig reagieren und so zwei Pyrimidinbasen verkoppelt werden, wenn sie sich auf den beiden DNA-Strängen gegenüberliegen (29, 30, 45, 46, 47, 48) (Abb. 15).

Solche Querverbindungen werden nicht mit Molekülen erzielt, die wie etwa das Angelicin nur monofunktionale Addukte bilden können (49). Gerade diese Querverbindungen scheinen aber für den biologischen Effekt von großer Wichtigkeit zu sein (50, 51).

Zum Problem der Bindungsart sei bemerkt, daß wohl noch keine endgültigen Ergebnisse vorliegen. Jedenfalls äußerte sich CHANDRA während des Deutsch-Schwedischen Symposions über Photomedizin in Oberursel vom 23. bis 25. April 1975 auf eine Diskussionsbemerkung von FAHR hin in dieser Weise (52).

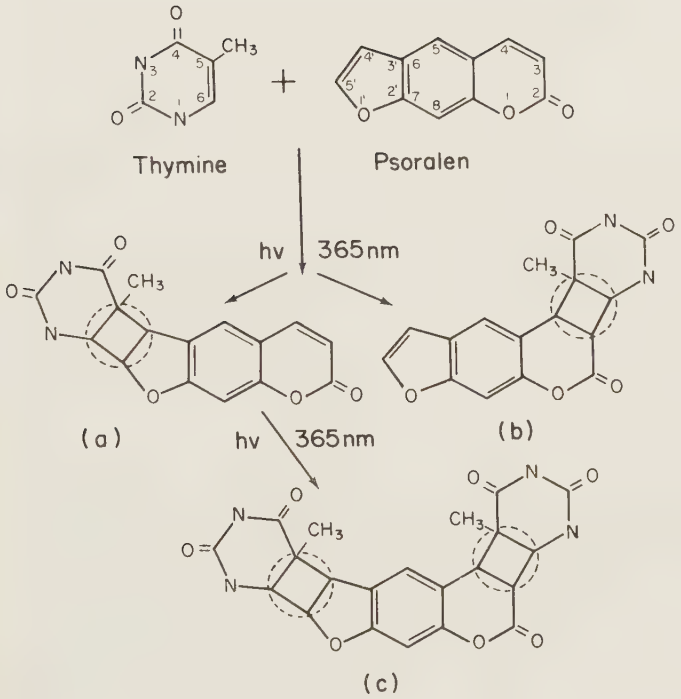

Abb. 15: Die 3 Möglichkeiten der Interaktion eines Psoralenmoleküls mit der DNA-Base Thymin unter UVA-Bestrahlung (aus: WALTER, J.F., VOORHEES, J.J., KELSEY, W.H., DUELL, E.A.: Psoralen plus black light inhibits epidermal DNA synthesis. Arch.Dermatol.107, 861-865 (1973))

Auf diesem Symposion wurde auch ein im Zusammenhang dieser Arbeit besonders interessierendes Problem diskutiert, nämlich die Frage, ob ein Effekt von 8-MOP und UVA auf die dermalen Blutgefäße und die darin zirkulierenden Blutzellen vorhanden ist (53).

WULF verwies dazu auf seine Arbeit, in der er toxische Effekte des 8-MOP nur in Konzentrationen beobachtete, die höher ware als 10^{-4} M (54). Nachdem diese Konzentrationen sehr viel höher sind als der Plasma-8-MOP-Spiegel, wie er bei Patienten, die unter Photochemotherapie stehen, erreicht wird, schloß er daraus, daß die Leukozyten wohl nicht von dieser Behandlung berührt würden. Im Gegensatz zu dem experimentellen Vorgehen, wie es in dieser Arbeit beschrieben ist, verwandte er jedoch Alkohol, um die Löslichkeit des 8-MOP zu erhöhen. Dies könnte die unterschiedlichen Befunde erklären.

Die Ergebnisse, die in Abb. 7 dieser Arbeit dargestellt sind, sind jedoch der eindeutige Beweis dafür, daß in den peripheren Lymphozyten des Menschen in vivo tatsächlich 8-MOP-Konzentrationen erreicht werden, die imstande sind, die Lymphozyten gegenüber einer nachfolgenden UVA-Bestrahlung empfindlich zu machen.

Die Frage ist nun, ob auch die UVA-Dosis während der Photochemotherapie genügend hoch ist, so daß die in den Hautkapillaren kreisenden Lymphozyten sowohl genügend stark, als auch genügend lange dem UVA-Licht ausgesetzt sind.

Es ist schon gesagt worden, daß UVA gut in die Dermis penetriert (34, 35, 36), zur eigentlichen Frage jedoch fehlen im Moment noch die experimentellen Befunde. Da aber eine Bejahung dieser Frage praktisch bedeuten würde, daß die Photochemotherapie eine systemische Immunsuppression darstellt, wäre ein entsprechender Befund von größter Bedeutung.

Die Befunde, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, lassen jedoch etwas anderes vermuten, und zwar aus folgenden Gründen:

Zusätzlich zur 8-MOP-Konzentration und UVA-Bestrahlungsdauer scheint für die Effektivität der DNA-Synthese-Hemmung die jeweilige Phase des Zellzyklus von Bedeutung zu sein (Abb.12).

Befunde anderer Forschergruppen (55, 56, 57) würden die zwei Gipfel der Empfindlichkeit in Abbildung 12 ausgezeichnet erklären, da diese Autoren zeigen konnten, daß PHA-stimulierte menschliche Lymphozyten während der 72 Stunden Inkubationszeit zum überwiegenden Teil zwei Teilungen durchmachen. Somit synthetisieren sie auch zweimal ihre DNA, und gerade diese Synthesephasen, die etwa nach 24-36 Stunden und dann wieder gegen Ende der Inkubationszeit ablaufen, zeigen die größte Empfindlichkeit gegenüber einer UVA-Bestrahlung. Das ist ja auch verständlich, da nur diese Phasen durch das Auftreten von UVA-induzierten Querverbindungen zwischen den DNA-Strängen, wie sie oben beschrieben sind, empfindlich gestört werden.

Zur Erklärung der unterschiedlichen Empfindlichkeit während der einzelnen Zellzyklusphasen muß aber noch ein weiterer Punkt berücksichtigt werden.

Dies ist die Tatsache, daß Veränderungen innerhalb der DNA, wie etwa solche Querverbindungen, durch Reparaturenzymsysteme korrigiert werden können; dies wurde auch bereits für die durch Psoralen plus UVA hervorgerufenen Veränderungen gezeigt (30, 58).

Treten nun solche Veränderungen während der G_o/G_1-Phase des Zellzyklus auf, so haben die Reparatursysteme viel Zeit zur Korrektur; nähert sich aber die Zelle der S-Phase, wird die Zeit zunehmend kürzer, die für eine Korrektur zur Verfügung steht, und die Photosensibilität nimmt damit zu (Abb. 16).

Aus Abbildung 12 geht weiter hervor, daß die enzymatischen Reparatursysteme schnell und sehr effizient arbeiten. Nur einige Stunden scheinen zu genügen, um die Integrität der DNA wieder herzustellen. In Anbetracht des nicht ausgeschlossenen erhöhten Risikos der Karzinomentstehung im Zusammenhang mit derartigen Manipulationen genetischen Materials sind diese Befunde beruhigend, obwohl sie noch der Bestätigung an anderen Zellsystemen bedürfen.

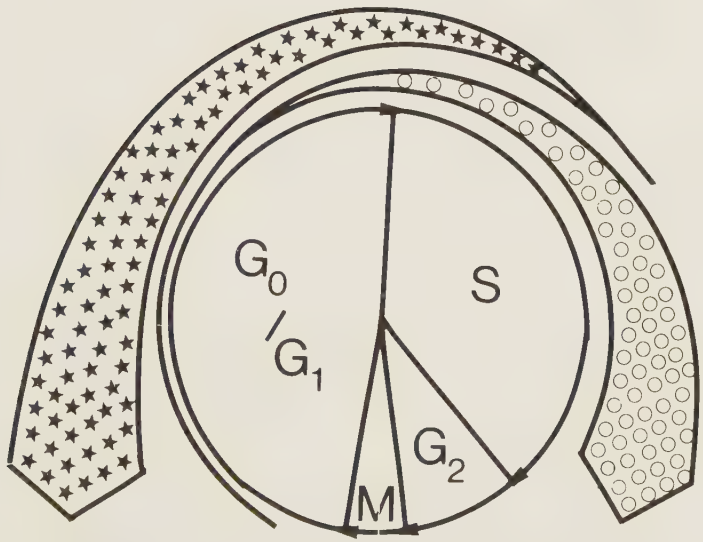

Abb. 16: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber einer UVA-Bestrahlung während verschiedener Zellzyklusphasen nach Behandlung der Zellen mit Psoralen

Es ist berichtet worden, daß 4 Patienten mit Xeroderma pigmentosum nach Photochemotherapie eine große Anzahl maligner Hauterkrankungen und einer eine lymphatische Leukämie entwickelten (59). Man weiß, daß Patienten mit Xeroderma pigmentosum an einem zellulären Defekt der DNA-Reparatursysteme leiden (30). Die beschriebenen Folgen der Photochemotherapie bei diesen Patienten weisen besonders eindrucksvoll auf die Bedeutung der DNA-Reparaturmechanismen in den Zellen hin, die bei dieser Therapieform eine so große Rolle spielen.

Aufgrund unserer gegenwärtigen Kenntnisse ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß sich während einer Langzeitbehandlung mit 8-MOP und UVA die zellulären DNA-Reparatursysteme nicht bei allen Patienten als ausreichend wirksam erweisen.

Auf der anderen Seite könnte eine Langzeitbehandlung mit der Photochemotherapie die DNA-Reparaturmechanismen stimulieren, und zwar im Sinne einer Enzyminduktion. Dies würde das Risiko einer Karzinomentstehung sogar vermindern.

Um diese Möglichkeiten genauer abzuklären, sind weitere Forschungen notwendig.

8-MOP plus UVA beeinträchtigt, wie wir gesehen haben, die Lymphoblastenbildung, also die Proliferation der Lymphozyten. Die in den peripheren Blutgefäßen kreisenden Lymphozyten befinden sich jedoch gewöhnlich im Ruhezustand und nicht im Zustand der Proliferation.

Diese Tatsache zusammen mit dem vorher Ausgeführten legt den Schluß nahe, daß auch hohe Dosen von 8-MOP plus UVA keine systemische Immunsuppression bewirken. Der Effekt der Photochemotherapie scheint vielmehr auf einer lokalen immunsuppressiven Wirkung zu beruhen.

Die guten therapeutischen Resultate bei Mykosis fungoides (24, 37, 38), atopischem Ekzem (60) und mikrobiellem Ekzem (8, 12) bestätigen diese Hypothese. Bei allen diesen Erkrankungen treten lokale entzündliche Infiltrate der Haut auf, die proliferierende B- und T-Lymphozyten (61) enthalten, welche, wie durch diese Arbeit nachgewiesen, ein mögliches Ziel der kombinierten Wirkung von 8-MOP plus UVA darstellen.

Auch bei der Psoriasis mag der therapeutische Erfolg der Photochemotherapie wenigstens zum Teil auf deren Einfluß auf proliferierende Zellen in den entzündlichen Infiltraten zurückzuführen sein.

Der hervorragende therapeutische Effekt bei der generalisierten Psoriasis pustulosa (62) zeigt darüber hinaus, daß dieser Einfluß wohl tatsächlich nicht nur auf die Epidermis beschränkt ist.

Die Hypothese der lokalen Immunsuppression durch Photochemotherapie bedarf natürlich noch weiterer eingehender Untersuchungen zu ihrer Bestätigung.

Eine interessante Möglichkeit hierzu wäre eine Testung des Überlebens von Hauttransplantaten an Versuchstieren, die unter Photochemotherapie stehen.

Es gibt bereits Arbeiten, die aus einem anderen Blickwinkel heraus das Problem betrachten und die sowohl mit den in dieser Arbeit vorgestellten Befunden als auch mit den daraus abgeleiteten Schlußfolgerungen in gutem Einklang stehen.

Es handelt sich dabei besonders um die Untersuchungen von SWANBECK und Mitarbeitern über das Auftreten von Chromosomenaberrationen in menschlichen Lymphozyten nach Behandlung mit 8-MOP und UVA. Diese Autoren konnten zeigen, daß so behandelte Lymphozyten signifikant gehäuft Chromosomenaberrationen aufwiesen [83, 84]. Ein im Zusammenhang mit dieser Arbeit höchst interessanter Befund, benutzte SWANBECK für seine Studien doch praktisch dieselben Versuchsanordnungen, wie sie in dieser Arbeit beschrieben sind.

Seine in-vitro-Studien erbrachten darüber hinaus Ergebnisse, die klare Dosisabhängigkeiten der Effekte der Behandlung mit 8-MOP und UVA annehmen ließen. Solche Abhängigkeiten konnten auch andere Autoren zeigen [30, 51] und auch die vorliegende Arbeit macht sie deutlich (Abb. 5, 6, 8, 9).

Bei seinen kombinierten in-vivo-in-vitro-Versuchen an Patienten konnte SWANBECK solche Abhängigkeiten zwar nicht feststellen [83], doch auch er konnte bestätigen, daß die therapeutische in-vivo-Konzentration

von 8-MOP in den peripheren Lymphozyten bei diesen Versuchen hoch genug ist, um eine eindeutige Sensibilisierung dieser Zellen gegenüber einer nachfolgenden UVA-Bestrahlung hervorzurufen. Bei seinen Versuchen bedeutete dies, daß vermehrt Chromosomenaberrationen in so behandelten Zellen auftraten.

Sowohl er als auch CARTER fanden heraus, daß Schwesterchromatidvertauschungen, die einen empfindlichen Indikator für chromosomale Schädigungen darstellen, bei derartigen Versuchen stark zunehmen (64, 65).

Interessanterweise konnten Chromosomenveränderungen bei reinen in-vivo-Versuchen nicht in vermehrtem Maß nachgewiesen werden (63). Dies steht aber im Einklang mit unserer Vorstellung, daß die zirkulierenden peripheren Lymphozyten nicht durch die Photochemotherapie beeinträchtigt werden, da sie sich ja nicht im Stadium der Proliferation befinden.

Die proliferierenden Lymphozyten in den entzündlichen Infiltraten der Haut jedoch sind solchen Untersuchungen nur schwer zugänglich. Da sie aber viel eher zu den Zellen gehören, die von der Photochemotherapie berührt werden könnten, da andererseits aber noch nicht experimentell gezeigt werden konnte, daß tatsächlich genügend viel UVA-Licht die dermalen Lymphozyten erreicht, um die beschriebenen molekularen und chromosomalen Effekte hervorzurufen, ist der Befund, der in Abbildung 14 dargestellt ist, von besonderer Bedeutung.

Es zeigt sich hier, daß kleine UVA-Dosen, jeweils im Abstand von 12 Stunden verabreicht, denselben Effekt haben, als wenn sie zusammenhängend gegeben werden. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, daß die dermalen Lymphozyten während einer Photochemotherapie genügend stark erfaßt werden.

In diesem Zusammenhang ist auch noch von Interesse, daß nach Aufnahme von 8-MOP in die Zellen eine UVA-Bestrahlung noch nach 72 Stunden äußerst effektiv ist (Abb. 12). Dies würde dafür sprechen, daß nur ein geringer Teil 8-MOP aus den Zellen in das umgebende Medium diffundiert ist, was Ausdruck einer physikalischen Bindung des 8-MOP an Kernstrukturen sein könnte, welche von MUSAJO gezeigt wurde (66).

Kontrollierte histomorphologische Studien über die Wirkung der Photochemotherapie auf die verzögerte zellgebundene allergische Reaktion nach intrakutaner Hauttestung könnten eine wertvolle Hilfe sein, um verhältnismäßig einfach experimentell weitere Aufschlüsse zu diesem Problem zu erhalten.

Wie oben bereits ausgeführt, korrigieren Reparaturenzymsysteme die durch die Photochemotherapie verursachten Veränderungen der DNA. Geschieht diese Reparatur nicht vollständig, resultiert daraus entweder eine chromosomale Schädigung oder die totale Hemmung der DNA-Replikation bei den Lymphozyten, die in der S-Phase getroffen wurden.

Nachdem Zellen, die in die S-Phase eingetreten sind und dort geblockt wurden, nicht in die G_o/G_1-Ruhephase des Zellzyklus zurückkehren können, beginnen sie bald zu degenerieren.

Die lichtmikroskopische Betrachtung von Semi-Dünnschnitten solcher Lymphozyten im Degenerationsprozeß zeigt auch wirklich ein ganz anderes Bild, als es nicht behandelte ruhende (Abb. 17) oder PHA-stimulierte Lymphozyten (Abb. 18) bieten. Bei den mit 8-MOP und UVA behandelten Zellen sind als Zeichen der Degeneraton gut die pyknotischen Zellkerne zu erkennen (Abb. 19).

Bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung von Dünnschnitten solcher Zellen werden schließlich noch weitere Degenerationsmerkmale deutlich: Angeschwollenes Zytoplasma und unterbrochene Kern- und Zytoplasmamembranen (Abb.22). Solche degenerativen Veränderungen zeigen weder ruhende (Abb. 20) noch PHA-stimulierte Lymphozyten (Abb. 21), die nicht einer kombinierten Behandlung mit 8-MOP und UVA unterzogen wurden.

Auch die Oberflächenstruktur, wie sie das Rasterelektronenmikroskop dem Auge erschließt, läßt bei unbehandelten Kontrollen sowohl ohne (Abb. 23) als auch mit PHA-Stimulation (Abb. 24) keine Schäden erkennen, wogegen bei Behandlung mit 8-MOP und UVA viele Lymphozyten nach 3 Tagen Inkubation zahlreiche Membranschäden aufzuweisen scheinen (Abb. 25) (67).

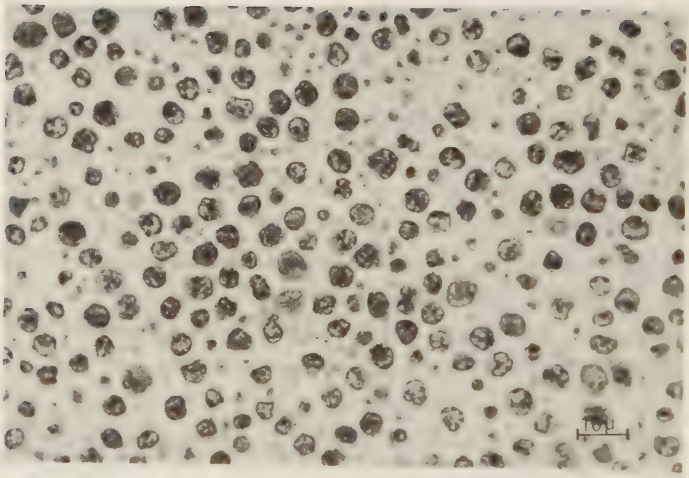

Abb. 17: Semi-Dünnschnitt von menschlichen peripheren Lymphozyten, die in vitro 3 Tage bei 37°C inkubiert wurden. x 680
(aus: SCHMOECKEL, C., SCHERER, R., KERN, B., BRAUN-FALCO, O.: The Cytolytic Effect of PUVA Treatment on PHA-stimulated Human Peripheral Lymphocytes. Acta Dermatovener (Stockholm) 58, 203-211 (1978)

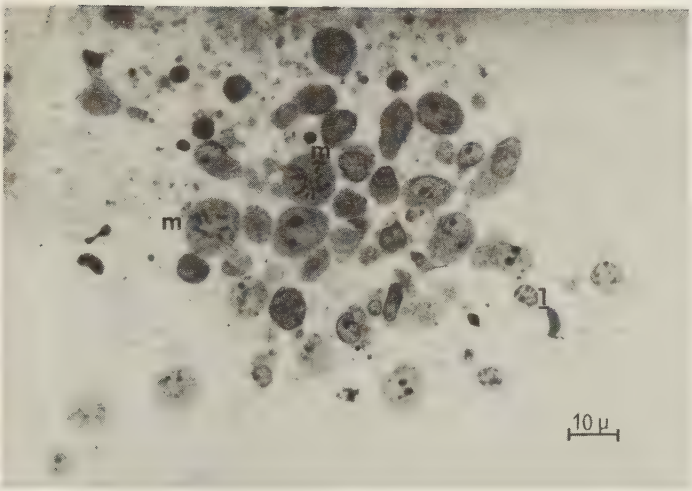

Abb. 18: Semi-Dünnschnitt PHA-stimulierter peripherer menschlicher Lymphozyten. Es zeigen sich Lymphoblasten, charakterisiert durch ihr reichliches Zytoplasma und ihre großen euchromatischen Kerne mit deutlichen Nucleoli. Einige nicht transformierte Lymphozyten (1), aber auch zwei Mitosen (m) sind zu erkennen. x 680
(aus: SCHMOECKEL, C., SCHERER, R., KERN, B., BRAUN-FALCO, O.: The Cytolytic Effect of PUVA Treatment on PHA-stimulated Human Peripheral Lymphocytes. Acta Dermatovener (Stockholm) 58, 203-211(1978)

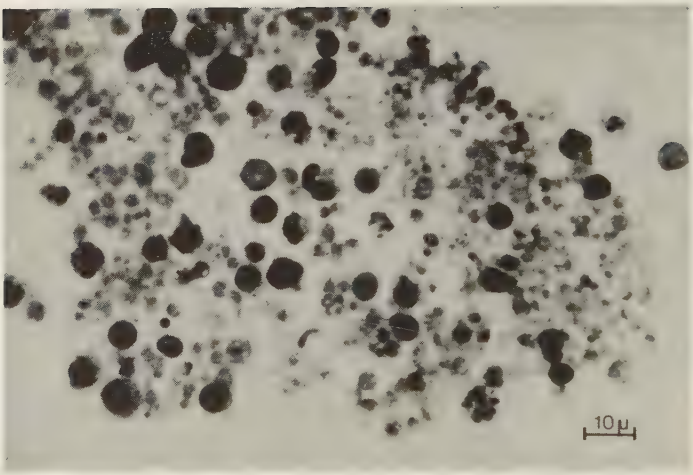

Abb. 19: Semi-Dünnschnitt von PHA-stimulierten peripheren menschlichen Lymphozyten, die mit 8-MOP und UVA behandelt wurden. Es fallen stark pyknotische Zellkerne auf, denen gelegentlich das umgebende Zytoplasma fehlt. x 680
(aus: SCHMOECKEL, C., SCHERER, R., KERN, B., BRAUN-FALCO, O.: The Cytolytic Effect of PUVA Treatment on PHA-stimulated Human Peripheral Lymphocytes. Acta Dermatovener. (Stockholm) 58, 203-211 (1978)

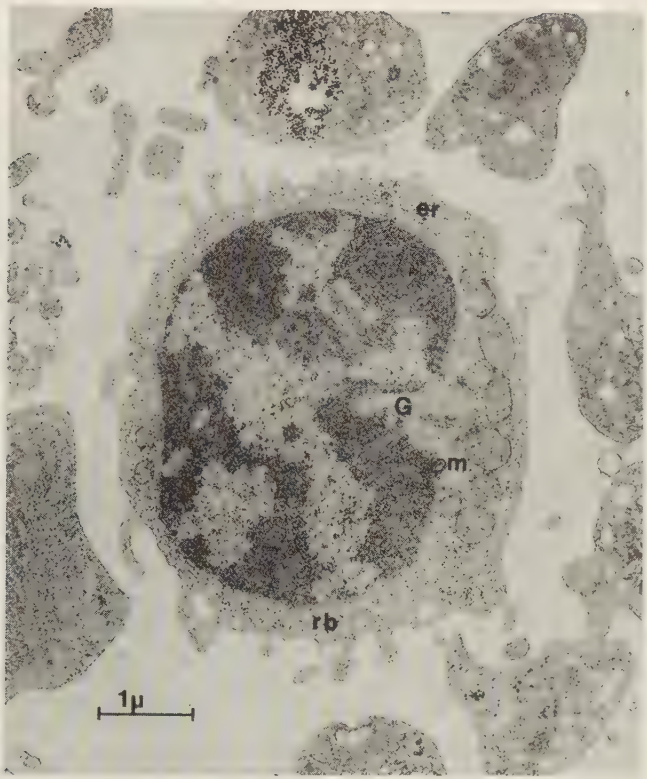

Abb. 20: Dünnschnitt eines menschlichen peripheren Lymphozyten, der in vitro 3 Tage bei 37°C inkubiert wurde. Es sind freie Ribosomen (rb), Mitochondrien (m), wenig endoplasmatisches Retikulum (er) und ein Golgi-Komplex (G) zu erkennen. Der Kern ist größtenteils heterochromatisch, wobei das Nucleoplasma entlang der Kernmembran verdichtet ist. Ein Nucleolus ist nicht vorhanden. x 19000 (aus: SCHMOECKEL, C., SCHERER, R., KERN, B., BRAUN-FALCO, O.: The Cytolytic Effect of PUVA Treatment on PHA-stimulated Human Peripheral Lymphocytes. Acta Dermatovener (Stockholm) 58, 203-211(1978)

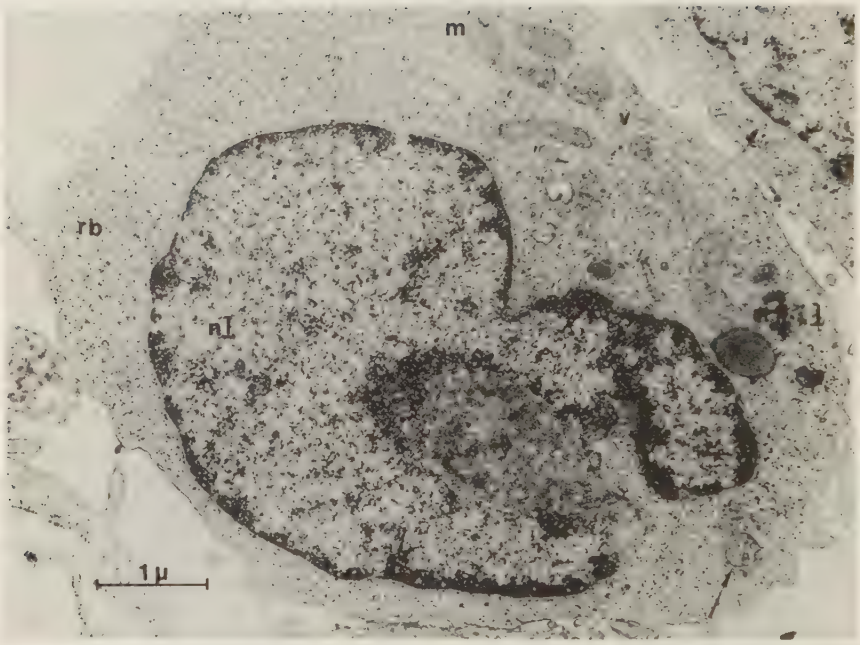

Abb. 21: Dünnschnitt eines PHA-stimulierten peripheren menschlichen Lymphozyten. Er hat einen größtenteils euchromatischen Zellkern mit einem großen Nucleolus (nl). Nur wenig Nucleoplasma ist entlang der Kernmembran verdichtet. Im Zytoplasma zeigen sich viele freie Ribosomen (rb), einige Mitochondrien (m), Vesikeln (v), Lysosomen (l) und ein Multivesikulärkörper (→). x18000 (aus: SCHMOECKEL, C., SCHERER, R., KERN, B., BRAUN-FALCO, O.: The Cytolytic Effect of PUVA Treatment on PHA-stimulated Human Peripheral Lymphocytes. Acta Dermatovener (Stockholm) 58, 203-211 (1978)

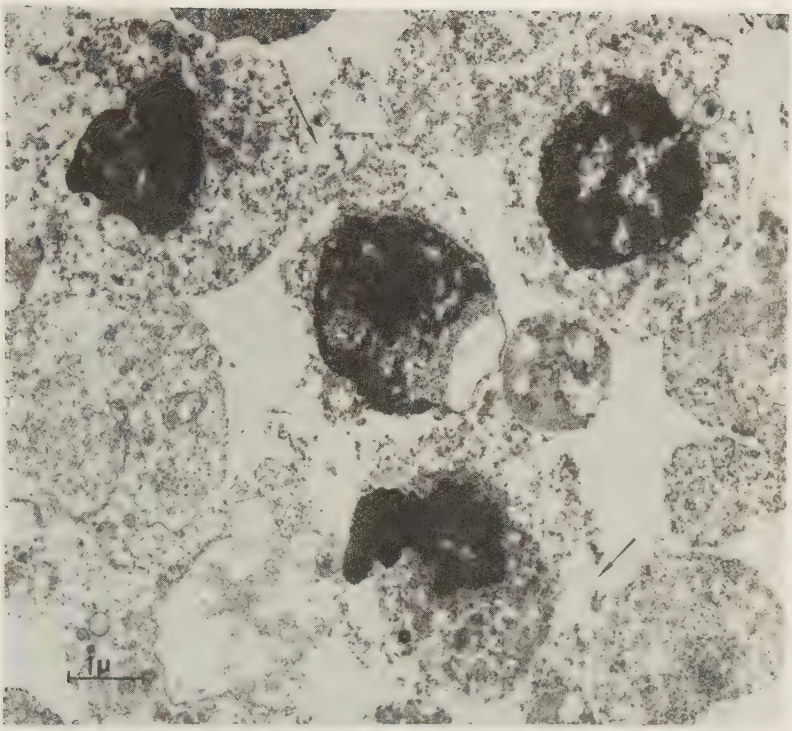

Abb. 22: Dünnschnitt von PHA-stimulierten peripheren menschlichen Lymphozyten, die mit 8-MOP und UVA behandelt wurden. Es zeigen sich zerstörte Zellen, deren Kerne klein und pyknotisch sind. Ihr Zytoplasma ist angeschwollen und zersetzt. Die Zytoplasma- und Kernmembranen scheinen vielfach aufgelöst zu sein (→).
x 11300
(aus: SCHMOECKEL, C., SCHERER, R., KERN, B., BRAUN-FALCO, O.: The Cytolytic Effect of PUVA Treatment on PHA-stimulated Human Peripheral Lymphocytes. Acta Dermatovener (Stockholm) 58, 203-211 (1978)

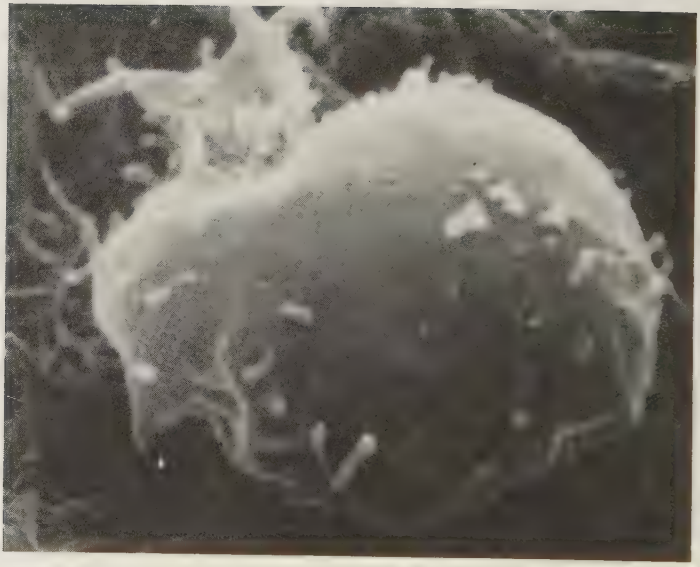

Abb. 23: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung eines peripheren menschlichen T-Lymphozyten. x 18900
(aus: SCHMOECKEL, C. SCHERER, R., KERN, B., BRAUN-FALCO, O.: The Cytolytic Effect of PUVA Treatment on PHA-stimulated Human Peripheral Lymphocytes. Acta Dermatovener (Stockholm)56, 203-211 (1976)

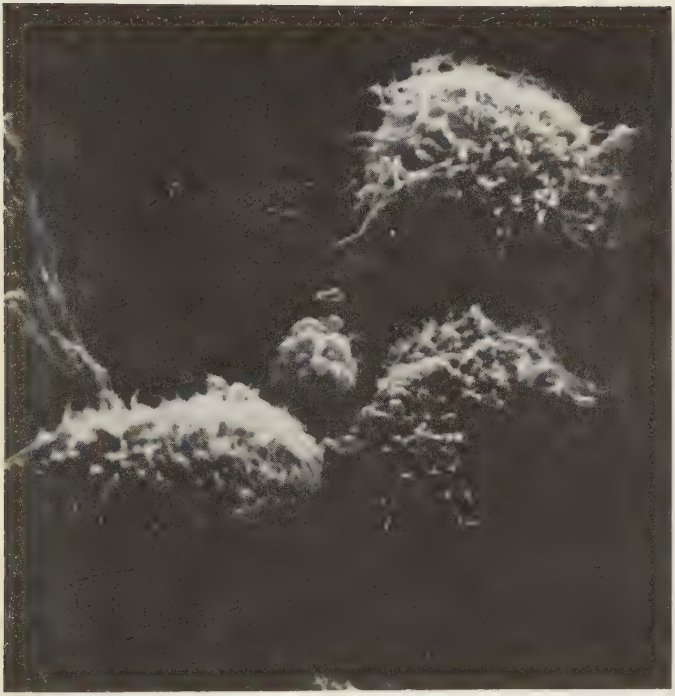

Abb. 24: Lymphoblasten, die durch Stimulation peripherer menschlicher T-Lymphozyten mit PHA entstanden sind, in der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung. x 3200
(aus: SCHMOECKEL, C., SCHERER, R., KERN, B., BRAUN-FALCO, O.: The Cytolytic Effect of PUVA Treatment on PHA-stimulated Human Peripheral Lymphocytes. Acta Dermatovener (Stockholm) 58, 203-211(1978)

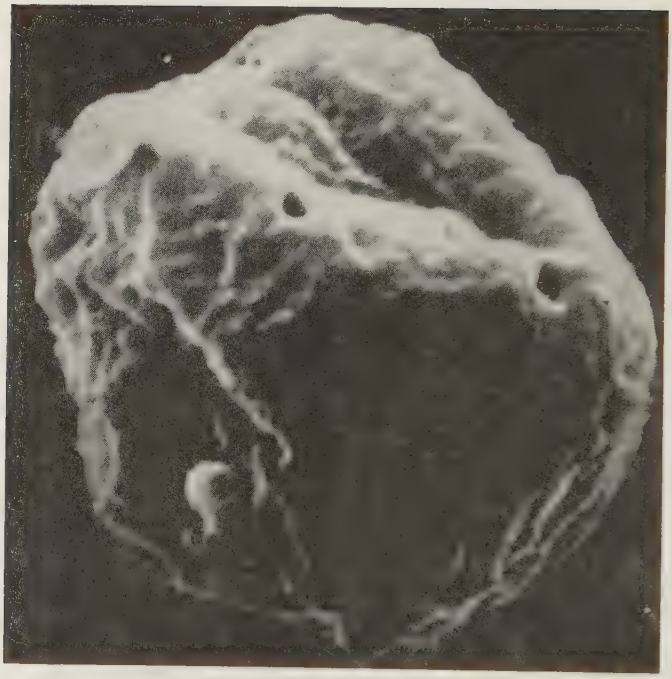

Abb. 25: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung eines PHA-stimulierten peripheren menschlichen Lymphozyten, der mit 8-MOP und UVA behandelt wurde. Die Zellmembran zeigt einige lochartige Läsionen. x20700
(aus: SCHMOECKEL, C., SCHERER, R., KERN, B., BRAUN-FALCO, O.: The Cytolytic Effect of PUVA Treatment on PHA-stimulated Human Peripheral Lymphocytes. Acta Dermatovener (Stockholm) 56, 203-211(1976)

Wir haben gesehen, daß das Zusammenwirken von 8-MOP und UVA an kultivierten peripheren menschlichen Lymphozyten zu folgenschweren funktionellen wie morphologischen Veränderungen führt.

Als Wirkungsmechanismen sind die Wechselwirkungen von 8-MOP mit der DNA unter UVA-Einwirkung dargestellt worden. Es ist aber nicht bekannt, ob sie die einzigen wichtigen molekularen Mechanismen sind, die bei der Photochemotherapie eine Rolle spielen. Es ist deshalb notwendig, Veränderungen der Membranpermeabilität, wie auch Veränderungen im RNA- oder Proteinstoffwechsel in weiteren Studien zu untersuchen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die peripheren Lymphozyten im Blut gesunder Spender dienten als Modellsystem, um den kombinierten Effekt von 8-Methoxypsoralen (8-MOP) und einer Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (UVA) zu untersuchen.

Gemessen wurde der ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA der Zellen, nachdem sie durch Phytohaemagglutinin (PHA) zur Proliferation angeregt worden waren. Die Proliferation von Zellen ist gekennzeichnet durch eine Neusynthese ihrer DNA, welche durch den ^{3}H-Thymidineinbau nachgewiesen werden kann.

Die Versuche wurden zunächst als in-vitro-Experimente durchgeführt; es erfolgten dabei sowohl die 8-MOP-Zugabe als auch die UVA-Bestrahlung in vitro. Es schlossen sich dann die kombinierten in-vivo-in-vitro-Versuche an, bei denen zwar die UVA-Bestrahlung wieder in vitro durchgeführt wurde, zuvor jedoch das 8-MOP nach oraler Einnahme von den Lymphozyten in vivo eingebaut wurde.

Bei den Versuchen waren folgende Ergebnisse zu verzeichnen:

1. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung des ^{3}H-Thymidineinbaus, wenn die Zellen sowohl mit 8-MOP, als auch mit UVA behandelt worden waren. Fehlte entweder das 8-MOP oder die UVA-Bestrahlung, war eine solche Hemmung nicht nachzuweisen. Bei den in-vitro-Versuchen konnte zudem eine Abhängigkeit dieser

Hemmung von den zugesetzten 8-MOP-Konzentrationen festgestellt werden.

2. Nachdem eine signifikante Hemmung auch bei den kombinierten in-vivo-in-vitro-Versuchen eintrat und das 8-MOP hierbei in therapeutischen Dosen verabreicht wurde, ist festzustellen, daß nach oraler Einnahme solcher Dosen 8-MOP die Lymphozyten gesunder Spender gegenüber einer nachfolgenden UVA-Bestrahlung in vitro empfindlich werden.

3. Sowohl bei den in-vitro-Versuchen als auch bei den kombinierten in-vivo-in-vitro-Experimenten ließ sich eine Abhängigkeit der DNA-Synthesehemmung von der Dauer der UVA-Bestrahlung zeigen.

4. Auch wenn die Bestrahlung zu verschiedenen Zeitpunkten während der Inkubationszeit erfolgte, war eine unterschiedliche Wirkung zu verzeichnen. Die Zellen waren am meisten empfindlich gegenüber einer UVA-Bestrahlung während ihrer DNA-Synthesephasen.

5. Wurden schließlich Lymphozyten, die in vitro mit 8-MOP behandelt worden waren, während der Inkubationszeit wiederholt dem UVA-Licht ausgesetzt, so konnte ein kumulativer Effekt der Bestrahlungen beobachtet werden.

Die vorgestellten Befunde lassen annehmen, daß entzündliche Infiltrate der Haut, die proliferierende Lymphozyten enthalten, durch eine systemische Photochemotherapie beeinflußt werden, da das UVA-Licht gut in die Dermis eindringt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. HOFMANN, C., PLEWIG, G., BRAUN-FALCO, O.:
Photochemotherapie der Psoriasis. Begleitheft zur wissenschaftlichen Ausstellung anläßlich der VIII. Fortbildungswoche für praktische Dermatologie und Venerologie, München, 26.-30. Juli 1976

2. EL-MOFTY, A.M.:
A Preliminary Clinical Report on the Treatment of Leucodermia with Ammi Majus Linn.
The Journal of the Royal Egyptian Medical Association 31, 651-665 (1948)

3. FAHMY, I.R., ABU-SHADY, H.:
Ammi Majus Linn.: Pharmacognostical Study and Isolation of a Crystalline Constituent.
Ammoidin. Quart. J. Pharm. & Pharmacol. 20, 281-291 (1947)

4. FULTON, J.E., LEYDEN, J., PAPA, C.:
Treatment of Vitiligo with Topical Methoxsalen and Blacklight.
Arch. Derm. 100, 224-229 (1969)

5. BUCK, H.W., MAGNUS, I.A., PORTER, A.D.:
The Action Spectrum of 8-Methoxypsoralen for Erythema in Human Skin. Preliminary Studies with a Monochromator.
Brit. J. Derm. 72, 249-255 (1960)

6. STEGMAIER, O.C.:
The Use of Methoxsalen in Sun Tanning.
J.Invest.Derm. (aus Suppl. zu Ausgabe 2/1959
mit den Seiten 129-391) 32, 345-349 (1959)

7. WEBER, G.:
Combined 8-methoxypsoralen and black light
therapy of psoriasis. Technique and results.
Brit.J.Derm.90, 317-323 (1974)

8. WEBER, G.:
Blacklight-Meladinine: Eine neue Dimension in
der Dermato-Therapie.
Deutsches Ärzteblatt 20, 1407-1416 (1975)

9. WACHTL, H.:
8-Methoxypsoralen-Blacklight-Therapie bei ver-
schiedenen Hautkrankheiten. Ein Erfahrungsbericht
aus der Praxis.
Z.Hautkr.50, 683-693 (1975)

10. TRONNIER, H., SCHÜLE, D.:
Zur dermatologischen Therapie von Dermatosen mit
langwelligem UV nach Photosensibilisierung der
Haut mit Methoxsalen. Erste Ergebnisse bei der
Psoriasis vulgaris.
Z.Haut-Geschl.Kr.48, 385-393 (1973)

11. TRONNIER, H., LOEHNING, R.:
About the Current Status of the Methoxsalen-UV-
A-Therapy in Dermatology.
Castellania 2, 267-271 (1974)

12. OBERSTE-LEHN, H., MORTAZAWI, S.A.M.:
Therapeutische Ergebnisse bei der Anwendung von 8-Methoxypsoralen (8-MOP) und UVA.
Z.Haut-Geschl.Kr.50, 559-571 (1975)

13. RODERMUND, O.-E., STEIN, G.:
Zur Therapie der Psoriasis. Über eine neue Möglichkeit der Psoriasis-Behandlung unter Anwendung von langwelligem UV-Licht und einem Photosensibilisator.
Fortschr.d.Med.30, 1484-1487 (1975)

14. MORTAZAWI, S.A.M., OBERSTE-LEHN, H.:
Lichtsensibilisatoren und ihre therapeutischen Fähigkeiten. Erste vorläufige Mitteilung.
Z.Haut-Geschl.Kr.48, 1-9 (1973)

15. SCHÜLE, D.:
Erfahrungen mit einer neuartigen Therapie bei Vibrosen der Haut.
Z.Haut-Geschl.Kr.49, 183-188 (1974)

16. WALTER, J.F., VOORHEES, J.J.:
Psoriasis Improved by Psoralen Plus Black Light.
Acta Dermatovener.53, 469-472 (1973)

17. PARRISH, J.A., FITZPATRICK, T.B., TANENBAUM, C., PATHAK, M.A.:
Photochemotherapy of Psoriasis with oral Methoxsalen and LongwaveUltraviolet Light.
New Engl.J.Med.291, 1207-1211 (1974)

18. WOLFF, K., HÖNIGSMANN, H., GSCHNAIT, F., KONRAD, K.:
Photochemotherapie bei Psoriasis.
DMW 48, 2471-2477 (1975)

19. WOLFF, K., FITZPATRICK, J.B., PARRISH, J.A., GSCHNAIT, F., GILCHREST, B., HÖNIGSMANN, H., PATHAK, M.A., TANENBAUM, C.:
Photochemotherapy for psoriasis with orally administered methoxsalen.
Arch.Derm. 112, 943 (1976)

20. BRAUN-FALCO, O.:
Photochemotherapie der Psoriasis.
Therapie der Gegenwart 6, 989-998 (1976)

21. WARIN, A.P., CARRUTHERS, J.A.:
Photochemotherapy in psoriasis.
Clin.Exper.Dermatol.1, 181-186 (1976)

22. BORN, A., BORN, W.:
Blacklight-Meladinine-Photochemotherapie (PUVA).
Akt.Dermat., 1, 187-198 (1975)

23. TRONNIER, H.:
Methoxsalen-UV-A-Therapie in der Dermatologie.
diagnostik 10, 392-394 (1975)

24. TRONNIER, H., LOEHNING, R.:
Photochemotherapie in der Dermatologie. In:
Photochemotherapie: Grundlage, Technik und Nebenwirkungen. Hrg.E.G.Jung. S.71. F.K.Schattauer Verlag Stuttgart - New York (1976)

25. HOFMANN, C., PLEWIG, G., BRAUN-FALCO, O.:
Technische Erfahrungen mit der 8-Methoxy-psoralen-Photochemotherapie bei Psoriasis vulgaris.
Hautarzt 27, 277 (1976)

26. HOFMANN, C., PLEWIG, G., BRAUN-FALCO, O.:
Klinische Erfahrungen mit der 8-Methoxypsoralen-UVA-Therapie (Photochemotherapie) bei Psoriasis.
Hautarzt 27, 588-594 (1976)

27. SCHERER, R., KERN, B., BRAUN-FALCO, O.:
The Human Peripheral Lymphocyte - a Model System for Studying the Combined Effect of Psoralen Plus Black Light.
Klin.Wochenschrift 55, 137-140 (1977)

28. STOTT, C.W., STASSE, J., BONOMO, R., CAMPBELL, A.H.:
Evaluation of the phototoxic potential of topically applied agents using long-wave ultraviolet light.
J.invest.Derm.55, 335 (1970)

29. WALTER, J.F., VOORHEES, J.J., KELSEY, W.H., DUELL, E.A.:
Psoralen plus black light inhibits epidermal DNA synthesis.
Arch.Dermatol.107, 861-865 (1973)

30. BADEN, H.P., PARRINGTON, J.M., DELHANTY, J.D.A., PATHAK, M.A.:
DNA synthesis in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts following treatment with 8-Methoxypsoralen and long wave ultraviolet light.
Biochim.Biophys.Acta 262, 247-255 (1972)

31. MUSAJO, L., VIGENTINI, P.A., BACCICHETTI, F.:
Preliminary Report on the protection from Ehrlich ascites tumor with tumor cells photoinactivated in the presence of psoralen or 8-Methyl-Psoralen.
Z.Naturforsch.25b, 642 (1970)

32. OGINSKY, E.L.:
Lethal photosensitization of bacteria with 8-MOP to long wavelength ultraviolet radiation.
J.Bacteriol.78, 821 (1959)

33. MUSAJO, L., RODIGHIERO, G., COLOMBO, G., TORLONE, V., DALL'AQUA, F.:
Photosensitizing furocoumarins: Interaction with DNA and photo-inactivation of DNA containing viruses.
Experientia 21, 22-24 (1965)

34. HANSEN, K.G.:
Transmission through skin of ultraviolet and visible radiation 280-500 nm. In: The biological effects of ultraviolet radiation. Ed.: F.Urbach, Pergamon Press, Oxford, p.159 (1974)

35. EVERETT, M.A., YEARGERS, E., SAYRE, R.M.:
Penetration of Epidermis by UV rays.
Photochem.Photobiol.5, 533 (1966)

36. PATHAK, M.A., EPSTEIN, J.H.:
Normal and abnormal reactions of man to light. In: Dermatology in General Medicine, T.B.FITZPATRICK, K.A.ARNDT, W.H.CLARK, et al., Eds. New York, McGraw-Hill, S.983-985 (1971)

37. GILCHREST, B.A., PARRISH, J.A., TANENBAUM, L., HAYNES, H.A., FITZPATRICK, T.B.:
Oral methoxsalen photochemotherapy of mycosis fungoides.
Cancer 38, 683 (1976)

38. HOFMANN, C., BURG, G., PLEWIG, G., BRAUN-FALCO, O.:
Photochemotherapie kutaner Lymphome. Orale und lokale 8-MOP-UVA-Therapie.
Dtsch.Med.Wschr. im Druck (1977)

39. ZINN, K.-H., BRAUN-FALCO, O.:
Der Lymphozytentransformationstest in der Dermatologie.
Hautarzt 27, 101-105 (1976)

40. EPSTEIN, J.H., FUKUYAMA, K.:
A study of 8-methoxypsoralen (8-MOP) induced phototoxic effects on mammalian epidermal macromolekular synthesis in vivo.
J.Invest.Dermatol.54, 350-351 (1970)

41. SCHERER, R., KERN, B. BRAUN-FALCO, O.:
UVA-induced Inhibition of Proliferation of PHA-stimulated Lymphocytes from Humans treated with 8-Methoxypsoralen
Brit.J.Dermatol. 97, 319 (1977)

42. DOUGLAS, J.D.:
Human lymphocyte response to phytomitogens.
Transplant.Rev.11, 39 (1972)

43. MUSAJO, L., RODIGHIERO, G., DALL'AQUA, F.:
Evidences of a photoreaction of the photosensitizing furocoumarins with DNA and with pyrimidine nucleosides and nucleotides.
Experientia 21, 24-26 (1965)

44. MUSAJO, L., RODIGHIERO, G.:
Studies on the photo-C_4-cycloaddition reactions between skin photosensitizing furocoumarins and nucleic acids.
Photochem.Photobiol.11, 27-35 (1970)

45. COLE, R.S.:
Light induced cross linking of DNA in the presence of a furocoumarin (psoralen): Studies with phage γ, Escherichia coli, and mouse leukemia cells.
Biochim.Biophys.Acta 217, 30-39 (1970)

46. PATHAK, M.A., KRÄMER, D.M.:
Photosensitization of skin in vivo by Furocoumarins (Psoralens).
Biochim.Biophys.Acta 195, 197-206 (1969)

47. KRÄMER, D.M., PATHAK, M.A.:
Photoaddition of psoralen and of 4,5,8-trimethylpsoralen to DNA.
Photochem.Photobiol.12, 333 (1970)

48. SHEN, C.K.I., HEARST, I.E.:
Psoralen-crosslinked secondary structure map of single-stranded virus DNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 2649 (1976)

49. CHANDRA, P., RODIGHIERO, G., BALIKCIOGLU, S., BISWAS, R.K.:
Nucleic Acid Modification by Furocoumarins and Light: Some Biomedical Implications. In: Photochemotherapie: Grundlage, Technik und Nebenwirkungen. Hrsg.: E.G.Jung, S.25-32, F.K.Schattauer Verlag Stuttgart - New York (1976)

50. DALL'AQUA, F., MARCIANI, S., CIAVATTA, L., RODIGHIERO, G.:
Formation of interstrand crosslinks in the photoreactions between furocoumarins and DNA.
Z.Naturforsch. (8) 26, 561-569 (1971)

51. DALL'AQUA, F., MARCIANI, S., VEDALDI, D., RODIGHIERO, G.:
Studies on the Photoreactions (365 nm) between DNA and some Methylpsoralens.
Biochim.Biophys.Acta 353, 267-273 (1974)

52. CHANDRA, P.:
Diskussionsbeitrag. In: Photochemotherapie: Grundlage, Technik und Nebenwirkungen. Hrsg.: E.G.Jung, S.62, F.K.Schattauer Verlag Stuttgart - New York (1976)

53. BREIT, A.:
Diskussionsfrage. In: Photochemotherapie: Grundlage, Technik und Nebenwirkungen. Hrsg.: E.G.Jung, S.127, F.K.Schattauer Verlag Stuttgart - New York (1976)

54. WULF, H.C.,WETTERMARK, G.:
Effect of dyes and light on cultured humand cells. In: Photochemotherapie: Grundlage, Technik und Nebenwirkungen. Hrsg.: E.G.Jung, S.105-109, F.K. Schattauer Verlag Stuttgart - New York (1976)

55. HOLE, H., DREISS, M.:
Über die Wirkung von ultraviolettem Licht auf menschliche Chromosomen.
Arch.Derm.Forsch.252, 23-38 (1975)

56. BENDER, M.A., PRESCOTT, D.M.:
DNA Synthesis and mitosis in cultures of human peripheral leukocytes.
Experimental Cell Research 27, 221-229 (1962)

57. SASAKI, M.S., NORMAN, A.:
Proliferation of human lymphocytes in culture.
Nature (Lond.) 210, 913-914 (1966)

58. COLE, R.S.:
Repair of DNA containing interstrand crosslinks in Escherichia coli. Sequential excision and recombination.
Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.) 70, 1064 (1973)

59. REED, W.B.:
Letters to the editor: Treatment of psoriasis with oral psoralens and longwave ultraviolet light.
Acta Dermatovener.56, 315 (1976)

60. MORISON, W.L., PARRISH, J.A., FITZPATRICK, T.B.:
Oral Psoralenphotochemotherapy of atopic eczema.
J.Invest.Dermat.67, 561 (1976)

61. HAGEDORN, M.:
Zur Morphologie und Monozytopoese der Mycosis fungoides.
Fortschritte der Medizin 95, 793 (1977)

62. HÖNIGSMANN, H., GSCHNAIT, F., KONRAD, K., WOLFF, K.:
Photochemotherapy for pustular psoriasis (Zumbusch).
Brit.J.Dermatol. im Druck (1977)

63. SWANBECK, G., THYRESSON-HÖK, M., BREDBERG, A., LAMBERT, B.:
Treatment of psoriasis with oral psoralens and longwave ultraviolet light.
Acta Dermatovener.55, 367-376 (1975)

64. SWANBECK, G., THYRESSON-HÖK, M. BREDBERG, A., LAMBERT, B.:
Letters to the editor: a reply.
Acta Dermatovener.56, 315-317 (1976)

65. CARTER, D.M., WOLFF, K., SCHNEDL, W.:
8-Methoxypsoralen and UVA promote sister-chromatid exchanges.
J.Invest.Dermatol.67, 548 (1976)

66. MUSAJO, L., RODIGHIERO, G., CAPORALE, G., DALL' AQUA, F., MARCIANI, S., BORDIN, F., BACCICHETTI, F., BEVILACQUA, R.:
Photoreactions betweeen skin-photosensitizing furocoumarins and nucleic acids. In: Sunlight and Man. Cons.Ed.: J.B.FITZPATRICK, S.369, University of Tokyo Press (1974)

67. SCHMOECKEL, C., SCHERER, R., KERN, B., BRAUN-FALCO, O.:
The Cytolytic Effect of PUVA Treatment on PHA-stimulated Human Peripheral Lymphocytes.
Acta Dermatovener. (Stockholm) 58, 203-211 (1978)

Die vorliegende Doktorarbeit wurde von März 1976 bis Februar 1977 an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. O.Braun-Falco danke ich für die großzügige Förderung der Arbeit und Herrn Dr. R. Scherer für seine Mühe und seinen Rat bei deren Betreuung.

Weiterhin möchte ich danken Frau Dr. C. Hofmann von der Lichtabteilung und Herrn Dr. C. Schmoeckel von der Elektronenmikroskopie.

Ebenso gebührt mein Dank den Herren Privatdozenten Dr. G. Plewig und Dr. G. Burg.

Für die ausgezeichnete technische Unterstützung danke ich Frl. A. Hess vom Immunhistochemischen Labor sowie Fr. E. Ebmeyer und Fr. F. Clauss vom Histochemischen Labor.

Nicht zuletzt möchte ich allen meinen Versuchspersonen, die sich so bereitwillig zur Verfügung gestellt haben,und allen Mitarbeitern der Dermatologischen Klinik meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf

8. August 1953	geboren in München Eltern: Dr. Bernhard Kern Oberregierungsdirektor Dr. Hanna Kern, geb. Strobel Fachärztin für Kinderkrankheiten Konfession: römisch-katholisch
Sept. 1959 - Juli 1963	Volksschule I an der Fürstenriederstraße in München
Sept. 1963 - Juli 1972	Ludwigsgymnasium in München, Abitur
Nov. 1972	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität München
27. August 1974	Ärztliche Vorprüfung
29. August 1975	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1976 - Febr. 1977	Doktorarbeit an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München
26. August 1977	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
14. November 1978	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung